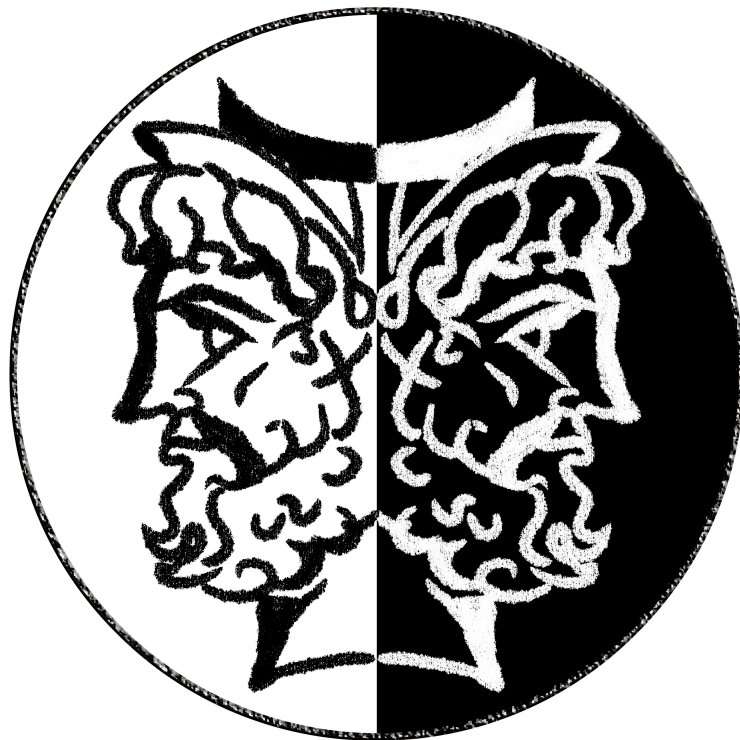




DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

CARACTERIZACIÓN DE LA CAPACIDAD ONCOGÉNICA DE LA PROTEÍNA QUIMÉRICA BCR-JAK2



ÁLVARO CUESTA DOMÍNGUEZ

Madrid, 2013

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA**



CARACTERIZACIÓN DE LA CAPACIDAD ONCOGÉNICA DE LA PROTEÍNA QUIMÉRICA BCR-JAK2

**Memoria de investigación
para optar al grado de Doctor
presentada por**

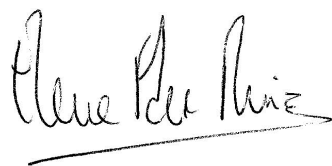
ÁLVARO CUESTA DOMÍNGUEZ
Licenciado en Bioquímica por la
Universidad Autónoma de Madrid

bajo la supervisión de:

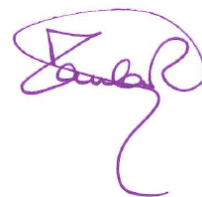
Dra. Elena Fernández-Ruiz y Dra. Paula Río Galdo

Madrid, 2013

El presente trabajo de investigación ha sido realizado en la Unidad de Biología Molecular del Hospital Universitario de La Princesa, supervisado por la Dra. Elena Fernández Ruiz, y en colaboración con la División de Terapias Innovadoras en el Sistema Hematopoyético del CIEMAT, supervisado por la Dra. Paula Río Galdo. Este trabajo ha sido financiado por los proyectos de la Fundación para la Investigación Biomédica de la Mutua Madrileña Automovilística, la Red Española de Investigación en Patología Infecciosa ISCIII-FEDER (RD07 0008/2006) y el Fondo de Investigaciones Sanitarias ISCIII-FEDER (PI 08/1772 y PI 11/00128).



Dra. Elena Fernández Ruiz



Dra. Paula Río Galdo

AGRADECIMIENTOS

¡Por fin! Parecía que el momento de escribir estas líneas no iba a llegar nunca y...

Es obvio que un trabajo como este no se hace sólo, y tengo muchísimo que agradecer a toda la gente que ha estado conmigo a lo largo de estos años. Este proyecto me ha llevado por varios centros de trabajo, viajes, cursos, congresos y seminarios donde he conocido a mucha gente cuyo trabajo ha muy sido estimulante.

Esta Tesis al igual que la proteína sobre la que versa, ha sido también “quimérica”, ya que se ha realizado en el Hospital de La Princesa (*in vitro*) y en el CIEMAT (*in vivo*).

A mi codirectora Elena, por confiar en mí para este proyecto, facilitar mi labor y haberme enseñado muchas cosas, no sólo desde el punto de vista científico. Gracias a los Servicios de Hematología e Inmunología del Hospital de La Princesa y sobre todo a la gente de la 9ª planta, especialmente a Mara, Marta, Paqui, Pedro, Patri, Piña y Mati. Gracias por enseñarme todo lo que sé, las risas, los ánimos en los malos momentos y por ese compañerismo tan genial que me habéis demostrado todos estos años.

Gracias a Juan Bueren por aceptar una colaboración que, en principio, me iba a llevar dos semanas al CIEMAT bajo la supervisión de Paula Río, y al final... ¡han pasado más de tres años! No puedo estar más en deuda con vosotros porque me habéis hecho sentir como uno más desde el principio. Especialmente en deuda estoy con mi codirectora Paula, sin cuya aportación esta tesis simplemente no existiría. Ha sido un verdadero placer y un auténtico lujo trabajar contigo, y espero haber aprendido al menos la décima parte de todo lo que me has enseñado: mi meta como científico es llegar a ser como tú algún día. Muchas gracias también a su grupo, especialmente Lara y Rocío, que me han tenido entre algodones. María^{peque}, has sido un apoyo grandísimo a todos los niveles. Millones de gracias al resto de becarios e investigadores, tanto de Hemato como de Epitelios, la gente del despacho, personal del Animalario y de limpieza. Me llevo un recuerdo increíble, muy divertido de este tiempo entre vosotros.

Además de compañeros de trabajo tengo que hacer una mención especial para los amigos, los que fueron y los que son, por darme fuerzas cuando ha habido turbulencias. A mis amigos de la facultad que siempre siempre están: Francis, Carol, Lucy, Nagore, Amaya, Luisja, Lidia y Coloma. También a otros clásicos: Marisa, Mikel Yuu y todos mis amigos de JNSP. A toda mi pandilla de Barcelona, especialmente Emilio, Laura y Jessi. A Rafa y Pepa, que también me han acompañado un buen trecho en este viaje.

Gracias especiales a los directores de arte de esta memoria de tesis: Ana Mirats, por ayudarme a maquetar el manuscrito, y José Manuel Hortelano Pi, el artista que ha ilustrado la portada. Gracias por ayudarme a ponerle un bonito envoltorio a este trabajo.

A todos mis profesores de la Facultad de CC. Biológicas y de Medicina de la UAM. Especialmente a Elena Escudero por transmitirnos su pasión por la ciencia, la investigación y el conocimiento en sus inspiradoras clases de Fisiología Animal.

Al tristemente ya extinto programa de movilidad ERASMUS, que me llevó a Copenhague y cambió mi vida por completo.

A todos mis ídolos musicales, que también me han acompañado virtualmente y han puesto a este trabajo una banda sonora muy importante para mí.

A Juanjo, por todo este tiempo a mi lado, por aguantar los agobios y la presión propias de estas lides, y sobretodo por haber sido capaz de que yo interiorizara que era capaz de sacar esto adelante. *Ets el millor*.

A mis padres, que me compraron el Quimicefa, la colección OMNI Science y mi primer microscopio, y a mi hermana por “prestarse” como “donante” de “muestras biológicas”. Gracias por haberme dado una educación en la aulas, pero sobre todo en la vida. Os debo todo lo que soy y me siento súper orgulloso de formar parte de esta familia.

RESUMEN

Las translocaciones cromosómicas que aparecen en algunos tumores producen frecuentemente genes de fusión que codifican proteínas quiméricas con un papel clave en los procesos de oncogénesis. Varios trabajos recientes han descrito una fusión génica BCR-JAK2 en pacientes con leucemia mieloide crónica y aguda, pero hasta ahora no había estudios sobre la caracterización funcional de esta nueva proteína quimérica.

En este trabajo hemos usado las técnicas de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) y RT-PCR para describir un gen de fusión *BCR-JAK2* en un paciente con leucemia aguda linfoblástica (LAL). BCR-JAK2 codifica una proteína que contiene el dominio de oligomerización de BCR fusionado al dominio tirosín-quinasa de JAK2. El análisis *in vitro* de transfectantes transitorios mostró que esta proteína se localiza en el citoplasma. Posteriormente, comprobamos que la línea prolinfocítica de ratón Ba/F3 transducida con vectores retrovirales que portan BCR-JAK2 se hace independiente de factores de crecimiento para proliferar debido a la activación constitutiva subsiguiente de STAT5, que trasloca al núcleo y activa la transcripción de genes diana como *Bcl-xL*, *Osm* y *Socs2*. Las células primarias de ratón que expresan BCR-JAK2 también muestran una mayor capacidad de proliferación y supervivencia. Por último, el tratamiento de la línea celular de ratón Ba/F3 con el inhibidor de JAK2 TG101209 demostró que este es capaz de suprimir la fosforilación de BCR-JAK2 y por tanto de STAT5, de modo que se reduce la expresión de genes diana y se activa el programa de muerte celular programada por apoptosis. Estos hallazgos sugieren que los pacientes adultos e infantiles con leucemia BCR-ABL- o sobreexpresión de JAK2 podrían beneficiarse de estas terapias moleculares dirigidas. Así, BCR-JAK2 es una nueva tirosín-quinasa con actividad transformadora que confiere independencia de estímulos para proliferar y sobrevivir y que puede ser inhibida por el compuesto TG101209.

Para estudiar las propiedades oncogénicas de BCR-JAK2 *in vivo* realizamos ensayos de tumorigénesis en ratones inmunodeficientes, que demostraron que las células Ba/F3 BCR-JAK2 son capaces de generar tumores subcutáneos. Posteriormente, hemos generado un modelo de leucemogénesis basado en el trasplante de progenitores de médula ósea con vectores retrovirales. Este modelo ha demostrado que la expresión de BCR-JAK2 en el compartimento hematopoyético conduce a un síndrome mieloproliferativo fatal con un período de latencia de 25 a 190 días y una supervivencia del 48%. Los animales trasplantados también mostraron síntomas típicos como leucocitosis, esplenomegalia, aumento de la población mieloide y presencia de progenitores mieloides tanto en sangre periférica como médula ósea.

En conjunto, todos estos datos demuestran las propiedades oncogénicas de BCR-JAK2 tanto *in vitro* como *in vivo*, y convierten nuestro modelo en una herramienta preclínica válida para el estudio de nuevos inhibidores de JAK2.

ABSTRACT

Chromosomal translocations in tumors frequently produce fusion genes coding for chimeric proteins with a key role in oncogenesis. Recent reports described a *BCR-JAK2* fusion gene in fatal chronic and acute myeloid leukemia, but the functional behavior of the chimeric protein remained uncharacterized.

We used fluorescence *in situ* hybridization and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) assays to describe a *BCR-JAK2* fusion gene from a patient with acute lymphoblastic leukemia. The patient has been in complete remission for six years following treatment and autologous transplantation, and minimal residual disease was monitored by real-time RT-PCR.

BCR-JAK2 codes for a protein containing the BCR oligomerization domain fused to the JAK2 tyrosine-kinase domain. *In vitro* analysis of transfected cells showed that BCR-JAK2 is located in the cytoplasm. Transduction of murine prolymphocytic Ba/F3 cells with retroviral vectors carrying BCR-JAK2 induced IL-3-independent cell growth, constitutive activation of the chimeric protein as well as STAT5 phosphorylation and translocation to the nuclei, where *Bcl-xL*, *Osm* and *Socs2* gene expression was elicited. Primary mouse progenitor cells transduced with BCR-JAK2 also showed increased proliferation and survival. Finally, treatment with the JAK2 inhibitor TG101209 abrogated BCR-JAK2 and STAT5 phosphorylation, decreased target gene expression and triggered apoptosis of transformed Ba/F3 cells. These findings suggest that adult and pediatric patients with BCR-ABL leukemia and JAK2 overexpression may benefit from targeted therapies. Therefore, BCR-JAK2 is a novel tyrosine-kinase with transforming activity. It deregulates growth factor-dependent proliferation and cell survival, which can be abrogated by the TG101209 inhibitor.

Moreover, transformed Ba/F3 cells developed tumors when injected subcutaneously into nude mice, thus proving the tumorigenic capacity of BCR-JAK2 *in vivo*. In order to prove BCR-JAK2 leukemogenic properties *in vivo*, we developed a retrovirally-transduced bone marrow transplantation animal model. This system has shown that expression of BCR-JAK2 in the hematopoietic compartment leads to a fatal myeloproliferative neoplasm with an onset period of 25 to 190 days and an overall survival rate of 48%. These transplanted mice also showed key features in these malignancies such as leukocytosis, splenomegaly, increased myeloid populations and the presence of immature myeloid progenitors both in peripheral blood and bone marrow.

Taken together these findings support the oncogenic properties both *in vitro* and *in vivo*, and place our model as a valid approach to test new JAK2 inhibitors before moving to the clinics.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AR	Artritis reumatoide
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AZA	5-aza-citidina
bp	<i>Base-Pairs</i> , pares de bases
CMH	Célula madre hematopoyética
CMH-CP	Célula madre hematopoyética a corto plazo
CMH-LP	Célula madre hematopoyética a largo plazo
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i> , proteína verde fluorescente mejorada
EPO	Eritropoyetina
EpoR	Receptor de EPO
ET	<i>Essential thrombocytemia</i> , trombocitemia esencial
FDA	<i>Food and Drug Agency</i> , Agencia de Alimentos y Medicamentos
FISH	<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i> , hibridación in situ de fluorescencia
FS	<i>Forward Scatter</i> , dispersión frontal
GAS	<i>Gamma Activated Sequence</i> , secuencia activada gamma
GH	<i>Growth Hormone</i> , hormona de crecimiento
Gy	Gray
Hb	Hemoglobina
IB	<i>Immunoblot</i> , inmunorevelado
IFN	Interferón
IL-3	Interleuquina 3
IL-5	Interleuquina 5
IP	Inmunoprecipitación
IRES	<i>Internal Ribosome Entry Site</i> , sitio interno de entrada para el ribosoma
ISRE	<i>Interferon-Stimulated Response Element</i> , elemento de respuesta estimulado por interferón

JAK	<i>Janus Kinase</i> , quinasa Jano
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
KO	<i>Knock-Out</i> , deficiente
LAL	Leucemia aguda linfoblástica
LMA	Leucemia mieloide aguda
LMC	Leucemia mieloide crónica
LNC	Leucemia neutrofílica crónica
LSK	Lin ⁻ Sca-1 ⁺ c-kit ⁺
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i> , repetición terminal larga
MF	Mielofibrosis
MO	Médula ósea
NK	Célula <i>Natural Killer</i>
NOD/SCID	<i>Non Obese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency</i> , Diabético no obeso/Inmunodeficiencia combinada severa
PCM	Progenitor común mieloide
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , reacción en cadena de la polimerasa
PEM	Progenitor eritroide-megacariocítico
PGM	Progenitor granulo-macrofágico
Ph⁺	Cromosoma Philadelphia
PV	Policitemia vera
RMC	Remisión molecular completa
RT-PCR	<i>Retrotranscriptase-Polymerase Chain Reaction</i> , Retrotranscriptasa-Reacción en cadena de la polimerasa
RV	Retrovirus
SH	<i>Src Homology</i> , homología Src
SLAM	<i>Signaling Lymphocytic Activation Molecule</i> , molécula de activación en señalización linfocitaria
SP	Sangre periférica
SS	<i>Side Scatter</i> , dispersión lateral
STAT	<i>Signal Transducer And Activator Of Transcription</i> , transductor de señales y activador de la transcripción
TBP	<i>TATA Binding Protein</i> , proteína de unión a caja TATA
Th	<i>T Helper Lymphocyte</i> , linfocito T de ayuda
TMO	Transplante de médula ósea

A mis padres, Juan y Sofía

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1.- ORGANIZACIÓN Y JERARQUÍA DEL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO	16
1.1.- CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS (CMHs)	17
1.2.- CÉLULAS MADRE Y PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS DE RATÓN	18
2.- VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE JAK/STAT	19
2.1.- ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS JAK	21
2.2.- LOCALIZACIÓN Y FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS JAK	22
2.3.- ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS STAT	22
2.4.- FUNCIONES DE LOS STATs	23
2.5.- GENES DIANA DE LOS STATs	24
2.6.- REGULACIÓN DE LA VÍA JAK/STAT	25
2.7.- JAKs EN SITUACIÓN PATOLÓGICA: MUTACIONES ACTIVADORAS Y PROTEÍNAS DE FUSIÓN	26
2.8.- PAPEL DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN STAT EN LA TRANSFORMACIÓN CELULAR Y LA ONCOGÉNESIS	27
3.- INHIBIDORES DE TIROSÍN-QUINASA: INHIBIDORES ESPECÍFICOS DE JAK	30
4.- MODELOS ANIMALES EN ONCOGÉNESIS	32
4.1.- MODELOS TRANSGÉNICOS	32
4.2.- MODELOS DE TRASPLANTE DE MÉDULA ÓSEA TRANSDUCIDA CON VECTORES RETROVIRALES	33
4.3.- MODELOS DE XENOTRASPLANTE	34

OBJETIVOS	35
------------------	-----------

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- DESCRIPCIÓN DEL CASO CLÍNICO	40
2.- ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	41
3.- LÍNEAS CELULARES Y REACTIVOS	41
3.1.- LÍNEAS CELULARES HUMANAS Y DE RATÓN	41
3.2.- CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS DE RATÓN	42
3.3.- ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN Y DE CINÉTICA DOSIS-RESPUESTA	43
4.- CONSTRUCCIONES DE PLÁSMIDOS Y VECTORES RETROVIRALES	44
5.- TRANSFECCIONES TRANSITORIAS EN LA LÍNEA CELULAR HEK293T	45
6.- PRODUCCIÓN DE SOBRENADANTES RETROVIRALES	45
7.- TRANSDUCCIÓN RETROVIRAL DE LÍNEAS CELULARES Y CÉLULAS PRIMARIAS DE RATÓN	46

8.- TRASPLANTE DE PROGENITORES DE MÉDULA ÓSEA EN HEMBRAS RECEPTORAS LETALMENTE IRRADIADAS	47
9.- CULTIVOS CLONOGÉNICOS	48
10.- ENSAYOS DE TUMOROGÉNESIS	48
11.- INMUNOFLUORESCENCIA	49
13.- ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO DE TEJIDOS DE RATÓN	49
14.- HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE <i>IN SITU</i> (FISH) SOBRE CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA DEL PACIENTE	50
15.- ANÁLISIS DE SUBPOBLACIONES HEMATOPOYÉTICAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO	51
16.- ESTUDIOS DE APOPTOSIS	51
17.- DIAGNÓSTICO MOLECULAR Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR RT-PCR Y QPCR	52
17.1.- PCR PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR DEL PACIENTE CON LAL	52
17.2.- AMPLIFICACIÓN Y CLONAJE DEL ADNc DE BCR-JAK2	53
17.3.- ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR RT-QPCR	53
17.4.- CÁLCULO DEL NÚMERO DE COPIAS INTEGRADAS DEL VECTOR (VCN)	54
18.- WESTERN BLOT Y ANTICUERPOS	56
19.- ESTUDIOS EPIGENÉTICOS: ANÁLISIS DEL ESTADO DE METILACIÓN DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL VECTOR RETROVIRAL	57
20.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO	58

RESULTADOS

1.- RESUMEN DEL CASO CLÍNICO	62
2.- IDENTIFICACIÓN DEL GEN DE FUSIÓN BCR-JAK2 EN UN PACIENTE CON LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA (LAL)	62
3.- DETECCIÓN DE LA FUSIÓN MEDIANTE HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i> CON SONDA FLUORESCENTE (FISH)	64
4.- SEGUIMIENTO DE LA ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL (EMR) DEL PACIENTE POR QPCR	65
5.- LA EXPRESIÓN ECTÓPICA DE BCR-JAK2 CONFIERE INDEPENDENCIA A FACTORES DE CRECIMIENTO	66
6.- BCR-JAK2 ESTÁ CONSTITUTIVAMENTE FOSFORILADA Y DISPARA LA ACTIVACIÓN DE STAT5	68

7.- INDUCCIÓN DE GENES DIANA DE STAT5 EN CÉLULAS QUE EXPRESAN BCR-JAK2	70
8.- EL INHIBIDOR DE JAK2 TG101209 ANULA LA ACTIVACIÓN DE BCR-JAK2 Y LA FOSFORILACIÓN DE STAT5	70
9.- EL INHIBIDOR TG101209 INDUCE MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS EN LA LÍNEA BA/F3 BCR-JAK2	73
10.- LA EXPRESIÓN DE BCR-JAK2 EN CÉLULAS BA/F3 INDUCE LA FORMACIÓN DE TUMORES EN RATONES INMUNODEFICIENTES	74
11.- LOS PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS DE RATÓN QUE EXPRESAN BCR-JAK2 MUESTRAN UN AUMENTO EN LA PROLIFERACIÓN Y LA SUPERVIVENCIA	77
12.- LA EXPRESIÓN DE BCR-JAK2 EN PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS DE RATÓN INDUCE UN SÍNDROME MIELOPROLIFERATIVO <i>IN VIVO</i>	77
13.- ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICO EN LOS TEJIDOS HEMATOPOYÉTICOS	80
14.- ANÁLISIS DEL NÚMERO DE COPIAS DEL PROVIRUS EN LOS RATONES TRASPLANTADOS CON PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS TRANSDUCIDOS	87
15.- EXPRESIÓN DE BCR-JAK2 <i>IN VIVO</i>	88
16.- ESTUDIO DE METILACIÓN DE LA SECUENCIA REGULADORA DE LA EXPRESIÓN DEL TRANSGÉN	90
 DISCUSIÓN	
1.-PACIENTE CON LAL-B PORTADOR DE BCR-JAK2	97
2.- BCR-JAK2 ES UNA PROTEÍNA TIROSÍN-QUINASA PLENAMENTE FUNCIONAL Y CONSTITUTIVAMENTE ACTIVA EN AUSENCIA DE SEÑALES DE PROLIFERACIÓN	99
3.- TG101209 INHIBE LA ACTIVACIÓN DE JAK2	102
4.- BCR-JAK2 POSEE CAPACIDAD ONCOGÉNICA <i>IN VIVO</i>	104
 CONCLUSIONES	109
 BIBLIOGRAFÍA	113
 ANEXO I: PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA MEMORIA DE TESIS DOCTORAL	137

CLAVE DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AR	Artritis reumatoide
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AZA	5-aza-citidina
bp	<i>Base-Pairs</i> , pares de bases
CMH	Célula madre hematopoyética
CMH-CP	Célula madre hematopoyética a corto plazo
CMH-LP	Célula madre hematopoyética a largo plazo
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i> , proteína verde fluorescente mejorada
EPO	Eritropoyetina
EpoR	Receptor de EPO
ET	<i>Essential thrombocytemia</i> , trombocitemia esencial
FDA	<i>Food and Drug Agency</i> , Agencia de Alimentos y Medicamentos
FISH	<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i> , hibridación in situ de fluorescencia
FS	<i>Forward Scatter</i> , dispersión frontal
GAS	<i>Gamma Activated Sequence</i> , secuencia activada gamma
GH	<i>Growth Hormone</i> , hormona de crecimiento
Gy	Gray
Hb	Hemoglobina
IB	<i>Immunoblot</i> , inmunorevelado
IFN	Interferón
IL-3	Interleuquina 3
IL-5	Interleuquina 5
IP	Inmunoprecipitación
IRES	<i>Internal Ribosome Entry Site</i> , sitio interno de entrada para el ribosoma
ISRE	<i>Interferon-Stimulated Response Element</i> , elemento de respuesta estimulado por interferón
JAK	<i>Janus Kinase</i> , quinasa Jano
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton

KO	<i>Knock-Out</i> , deficiente
LAL	Leucemia aguda linfoblástica
LMA	Leucemia mieloide aguda
LMC	Leucemia mieloide crónica
LNC	Leucemia neutrofílica crónica
LSK	Lin ⁻ Sca-1 ⁺ c-kit ⁺
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i> , repetición terminal larga
MF	Mielofibrosis
MO	Médula ósea
NK	Célula <i>Natural Killer</i>
NOD/SCID	<i>Non Obese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency</i> , Diabético no obeso/Inmunodeficiencia combinada severa
PCM	Progenitor común mieloide
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , reacción en cadena de la polimerasa
PEM	Progenitor eritroide-megacariocítico
PGM	Progenitor granulo-macrofágico
Ph⁺	Cromosoma Philadelphia
PV	Policitemia vera
RMC	Remisión molecular completa
RT-PCR	<i>Retrotranscriptase-Polymerase Chain Reaction</i> , Retrotranscriptasa-Reacción en cadena de la polimerasa
RV	Retrovirus
SH	<i>Src Homology</i> , homología Src
SLAM	<i>Signaling Lymphocytic Activation Molecule</i> , molécula de activación en señalización linfocitaria
SP	Sangre periférica
SS	<i>Side Scatter</i> , dispersión lateral
STAT	<i>Signal Transducer And Activator Of Transcription</i> , transductor de señales y activador de la transcripción
TBP	<i>TATA Binding Protein</i> , proteína de unión a caja TATA
Th	<i>T Helper Lymphocyte</i> , linfocito T de ayuda
TMO	Transplante de médula ósea

INTRODUCCIÓN

1.- Organización y jerarquía del sistema hematopoyético

El tejido hematopoyético es un sistema altamente organizado, jerarquizado y regulado en varios niveles por factores de transcripción, mecanismos epigenéticos, factores de crecimiento e interacciones con células estromales del propio nicho hematopoyético. Las células que lo conforman se ajustan a una estructura piramidal donde las células madre hematopoyéticas (CMH, del inglés *Hematopoietic Stem Cell*) son las que generan progenitores comprometidos a linaje linfoide (Kondo et al., 1997) y mieloide (Akashi et al., 2000), que darán lugar a más de 10 tipos de células maduras que incluyen eritrocitos, megacariocitos/plaquetas, células mieloides (monocitos/macrófagos y granulocitos), células T, células B, células NK y células dendríticas (Figura 1). Cada estadio de maduración se define por la expresión de determinados antígenos de superficie que sirven para caracterizar las poblaciones y su estado de diferenciación.

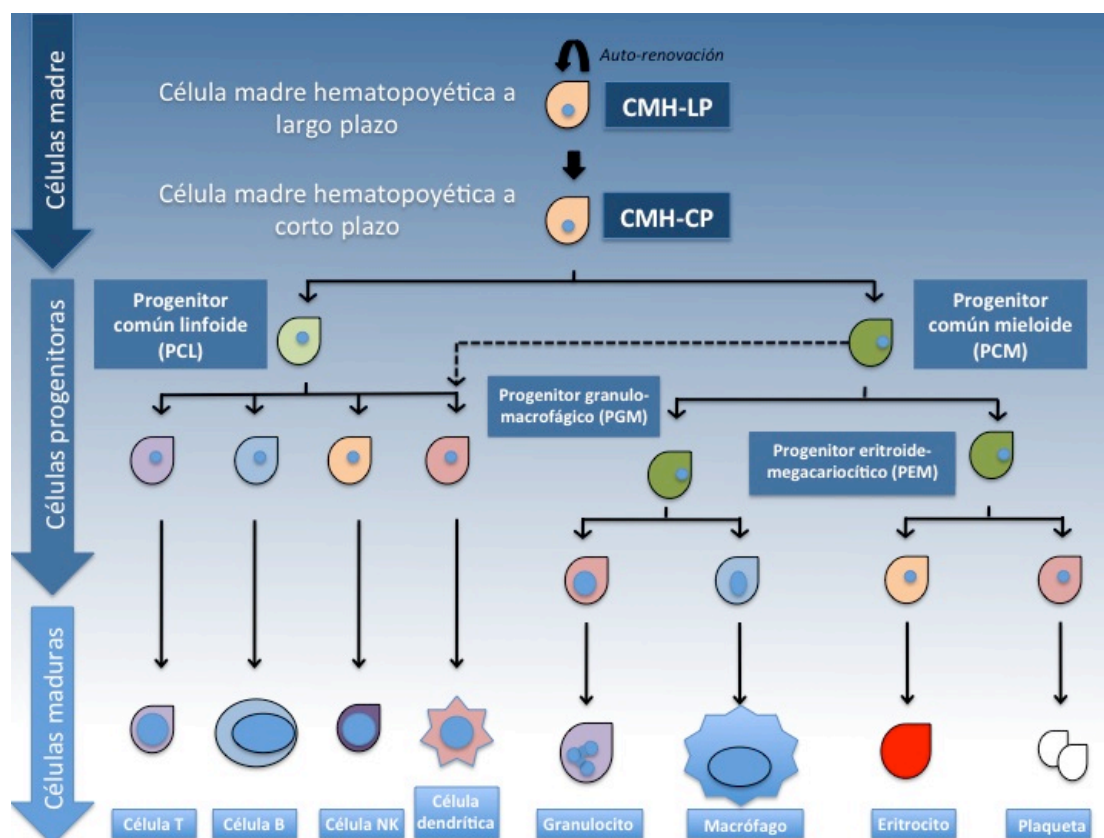


Figura 1: Representación esquemática de la jerarquización del sistema hematopoyético. Se muestran tres niveles de diferenciación: células madre, células progenitoras comprometidas a uno o varios linajes y células maduras y funcionales. Modificado de Soderberg y col. (Soderberg et al., 2009).

Este modelo asume que los progenitores intermedios son multipotentes y darán lugar a progenitores comprometidos a un linaje, que se diferenciarán finalmente a células maduras. Cada

progenitor posee un patrón de expresión distinto, de tal forma que cuando adquiere un fenotipo maduro ya no es posible cambiar su estado de diferenciación de forma natural debido a la pérdida de plasticidad y capacidad de automantenimiento (Soderberg et al., 2009).

En mamíferos las CMH residen en la médula ósea, que es el principal órgano donde tiene lugar la hematopoyesis del adulto y por tanto la generación de todos los tipos celulares de la sangre. Sin embargo, durante el desarrollo embrionario y fetal las CMH se localizan en múltiples órganos y regiones: en las primeras etapas pueden encontrarse en el saco vitelino y aorta-gonadal-mesonefros (AGM); más tarde la hematopoyesis tiene lugar en el hígado fetal, donde las CMH se expanden y diferencian para migrar al timo y al bazo. Cerca del final de la gestación la hematopoyesis del hígado y bazo concluye con la migración de las CMH a la médula ósea, donde permanecerán durante toda la vida adulta (Tavian and Peault, 2005, Peault and Tavian, 2003).

1.1.- Células madre hematopoyéticas (CMHs)

Las principales características que definen a una célula madre hematopoyética son:

- Automantenimiento a lo largo de divisiones celulares de carácter asimétrico. Esta característica permite a las células redistribuir el citoplasma de forma desigual en las células hijas, de forma que una permanece en el nicho manteniendo las características de la célula madre y la otra entra en procesos de diferenciación (Blank et al., 2008). Las células madre hematopoyéticas generan todos los tipos celulares circulantes en la sangre periférica, que tienen una vida media muy limitada, por lo que se necesita asegurar la producción continua de grandes cantidades de células. Precisamente estas capacidades definen a las células madre hematopoyéticas a largo plazo (CMH-LP), que tienen una elevada capacidad de autorenovación y son capaces de mantener la hematopoyesis de forma sostenida en el tiempo. Existe otro subconjunto de células que también puede generar células de cualquier estirpe sanguínea pero cuya capacidad de renovación es restringida y sólo pueden mantener la hematopoyesis *in vivo* durante un periodo limitado: son las células madre hematopoyéticas a corto plazo (CMH-CP).
- Multipotencialidad para dar lugar a todos los tipos celulares. En el desarrollo hematopoyético la multipotencialidad se va perdiendo poco a poco a medida que los progenitores se van comprometiendo a linajes específicos. En la figura 1 se puede apreciar que existen progenitores pluripotentes (CMH-LP y CMH-CP) y oligopotentes (PCL y PCM).
- Estado de quiescencia en situación de homeostasis hematopoyética. Sin embargo, en situaciones de estrés las CMHs salen de su estado quiescente para expandirse y diferenciarse rápidamente, y de esta forma volver a alcanzar la homeostasis. Esta propiedad de las CMHs no sólo es importante en la protección y mantenimiento del

reservorio, sino que es crítica también en la protección de las CMHs frente a la acumulación de mutaciones asociadas a la replicación del ADN celular (Orford and Scadden, 2008).

1.2.- Células madre y progenitores hematopoyéticos de ratón

El primer abordaje de purificación de CMHs de médula ósea de ratón se realizó por citometría de flujo multicolor y dio como resultado una población con fenotipo Thy-1^{low}, Lin⁻ y Sca-1⁺, que representa un 0,5% del total (Spangrude et al., 1988). Más tarde se identificó como marcador la molécula c-kit, también denominada CD117 (Ikuta and Weissman, 1992).

Las células madre hematopoyéticas de ratón con capacidad de reconstitución a largo plazo se definen por el fenotipo Lin⁻, Sca-1⁺ y c-kit⁺, por lo que se conoce a este subtipo celular como LSK (Ikuta and Weissman, 1992).

Años después se identificaron CMHs de ratones adultos en la fracción CD34⁻ de médula ósea (Osawa et al., 1996) y se reseñó que el receptor tirosina kinasa de tipo III (Flt3/Flk2) podría ser muy útil a la hora de discriminar poblaciones de CMHs. También se ha observado que la expresión de Flt3 va asociada a una pérdida de automantenimiento de las CMHs (Adolfsson et al., 2001).

A partir de estos estudios iniciales se han ido redefiniendo las CMHs de ratón en función de la ampliación con nuevos marcadores de superficie. Sólo algunas LSK tienen capacidad de reconstitución a largo plazo, y Weissman propuso que:

- las CMH-LP tienen un fenotipo LSK CD34⁻ Flk2⁻ Thy^{low}
- las CMH-CP tienen un fenotipo LSK CD34⁺ Flk2⁻ Thy^{low}

Posteriormente se ha demostrado que los miembros de la familia SLAM (*Signaling Lymphocytic Activation Molecule*) se expresan de forma diferencial entre las distintas subpoblaciones de células madre y progenitores hematopoyéticos. En la Figura 2 se muestra el código SLAM para las CMHs, progenitores multipotentes y oligopotentes del sistema hematopoyético de ratón.

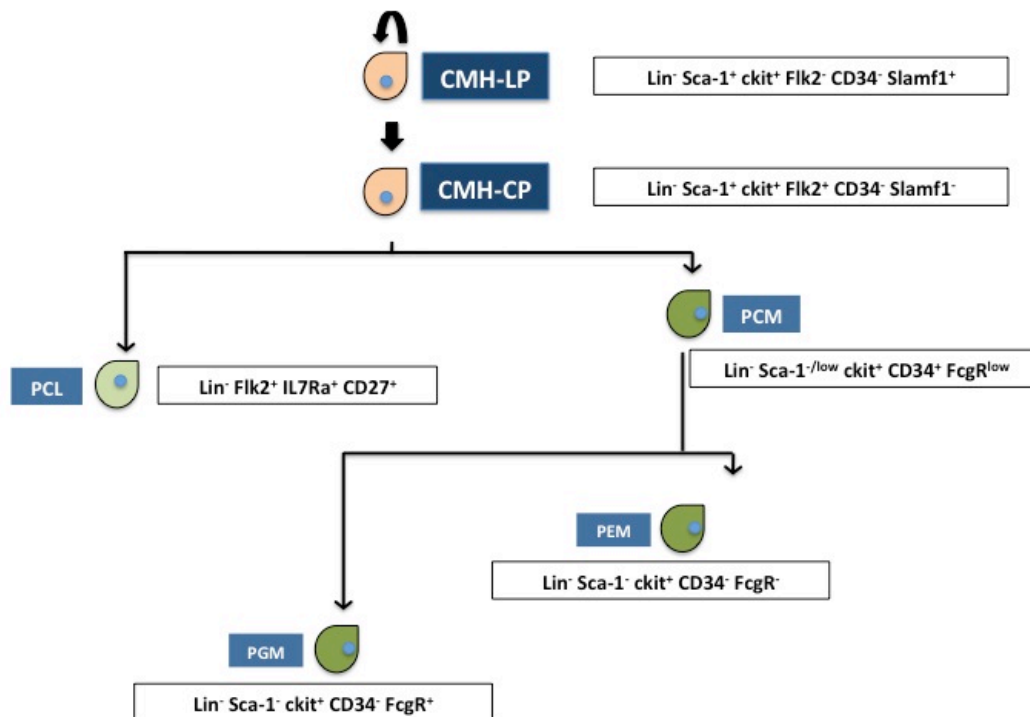


Figura 2: Esquema de los marcadores de diferenciación de CMHs y progenitores hematopoyéticos de ratón en el modelo de hematopoyesis jerarquizada. Se muestran las poblaciones de células madre hematopoyéticas (CMH) y progenitores, definidas en función de los marcadores que expresa en superficie, denominado código SLAM. PCM, progenitor común mieloide; PCL, progenitor común linfoide; PEM, progenitor eritroide-megacariocítico; PGM, progenitor granulomacrofágico. Adaptado de Seita y Weissman (Seita and Weissman, 2010).

Se ha descrito que las vías de JAK/STAT, la vía de PI3 quinasa y la vía de MAP quinasas son las rutas más implicadas en los procesos de diferenciación y proliferación de la hematopoyesis (Ward et al., 2000, Polak and Buitenhuis, 2012, Geest and Coffey, 2009).

2.- Vía de señalización de JAK/STAT

Las vías de señalización que median la transmisión de información entre células son esenciales en los procesos de crecimiento, desarrollo y homeostasis, y su desregulación implica enfermedades en numerosos casos. La vía de JAK/STAT (*Janus Tyrosine Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription*) es una cascada de señalización con un papel clave en procesos como la proliferación celular y la hematopoyesis.

La ruta comienza con la unión al receptor de una gran variedad de ligandos entre los que se encuentran hormonas (GH, hormona de crecimiento; EPO, eritropoietina), citoquinas (IFN, IL-3, IL-5) y factores de crecimiento (GM-CSF) (Figura 3). La unión de ligando es el estímulo necesario

para acoplar a los JAKs al dominio intracelular del receptor, de modo que se produce una fosforilación cruzada de ciertos residuos de tirosina. Esta fosforilación conlleva la dimerización de las moléculas STAT, que de esta forma son capaces de translocar al núcleo, donde interaccionan con el ADN y activan la transcripción de ciertos genes diana relacionados con procesos de supervivencia y proliferación.

La familia de proteínas STAT tiene un papel central en la transducción de señales desde el exterior de la célula hasta el interior del núcleo en respuesta a determinados factores y regulando muchos aspectos relacionados con el crecimiento, la supervivencia y el desarrollo. Son activadas por las proteínas JAK y su desacoplamiento está muy asociado a la formación de tumores, procesos de angiogénesis e incluso inmunosupresión, como demuestran los trabajos con ratones deficientes en estas proteínas, que presentan anomalías en el desarrollo del sistema inmune, la tolerancia inmunológica y la vigilancia del crecimiento tumoral (Akira, 1999).

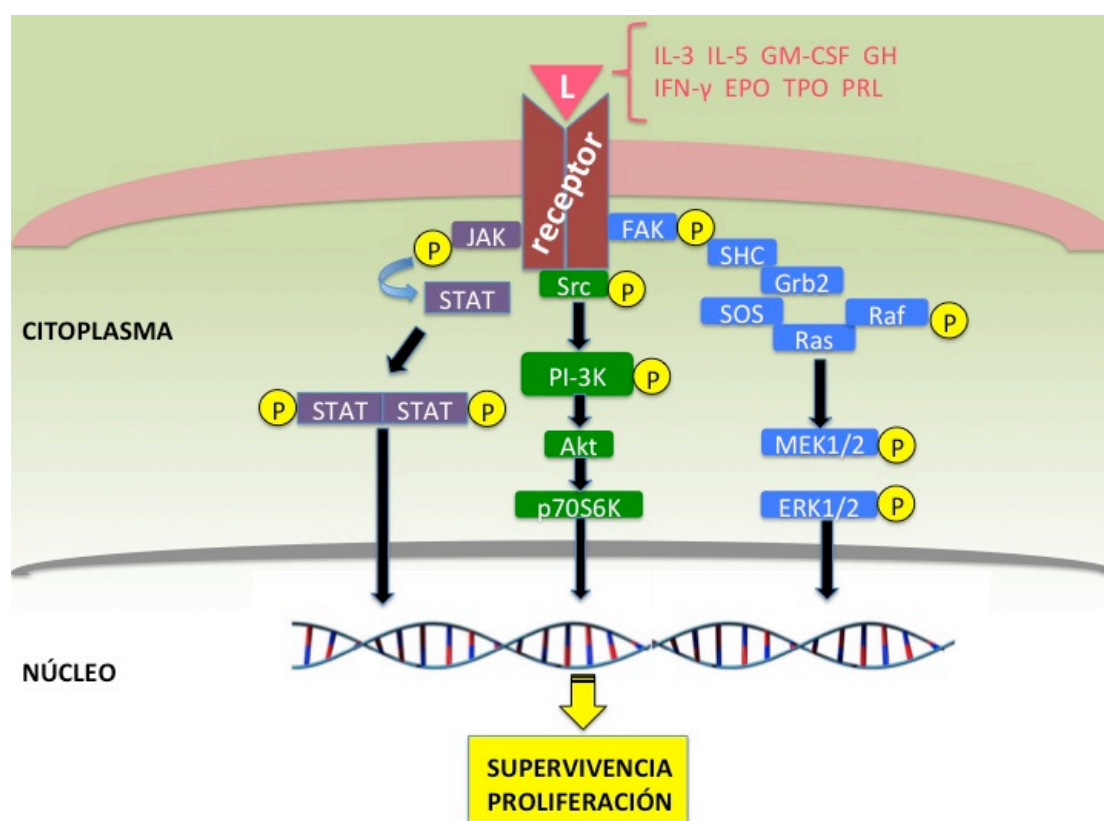


Figura 3: Modelo esquemático de la vía de señalización JAK/STAT. El receptor de membrana une el ligando y recluta a JAK, que es capaz de fosforilarse y fosforilar a STAT. STAT-P es capaz de dimerizar y translocar al núcleo celular para activar la transcripción de un programa génico relacionado con la supervivencia y la proliferación. En verde y azul aparecen las moléculas de la vía de PI3K y MAP quinasas, que también se activan y participan en distintos procesos de la hematopoyesis. L: ligando. Adaptado de Goffin y colaboradores (Goffin et al., 2005).

2.1.- Estructura de las proteínas JAK

En mamíferos, la familia de JAK está formada por 4 miembros: JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2. La estructura tridimensional de los 4 miembros de esta familia todavía no ha sido completamente resuelta debido a que son proteínas grandes de más de 1100 aminoácidos con pesos moleculares aparentes de 120-140 kDa, lo que hace complicado expresar y purificar la proteína cristalizada. La estructura primaria revela que existen 7 dominios de homología identificados (JH), numerados desde el extremo C-terminal hasta el N-terminal (Figura 4).

El dominio JH1 es el dominio tirosín-quinasa, donde reside la actividad catalítica de la proteína. Se han identificado varios sitios de autofosforilación en tirosinas dentro de este dominio, con diferentes implicaciones funcionales: en el caso de JAK2, la mutación en Y1007 elimina la actividad quinasa de la proteína (Feng et al., 1997) y la convierte en una candidata ideal para terapias moleculares dirigidas. El dominio JH2 es el dominio pseudo-quinasa y carece de actividad catalítica pero tiene una función reguladora esencial. Esta arquitectura en tándem es característica de las proteínas JAK y se convierte en motivo de su nombre en honor a Jano, dios romano con dos cabezas enfrentadas (ver portada). Se han descrito numerosas mutaciones dentro de este dominio que anulan la actividad quinasa (Chen et al., 2000, Saharinen et al., 2000). En la proteína JAK2 de mamíferos se ha demostrado que ciertas mutaciones inducidas experimentalmente pueden aumentar la actividad quinasa basal, pero también anular la activación dependiente de ligando (Saharinen and Silvennoinen, 2002).

El extremo amino terminal posee un dominio de similitud a SH2 (JH5-JH4), y un dominio de homología FERM (4.1, Ezrina, Radixina, Moesina) (JH6-JH7). Este último tiene un tamaño aproximado de 300 aminoácidos y está implicado en mediar interacciones con proteínas transmembrana tales como receptores de citoquinas. Determinados JAKs juegan un papel importante en la regulación de la expresión de receptores de algunas citoquinas (EPO, IFN) en la superficie celular (Velazquez et al., 1992, Huang et al., 2001).

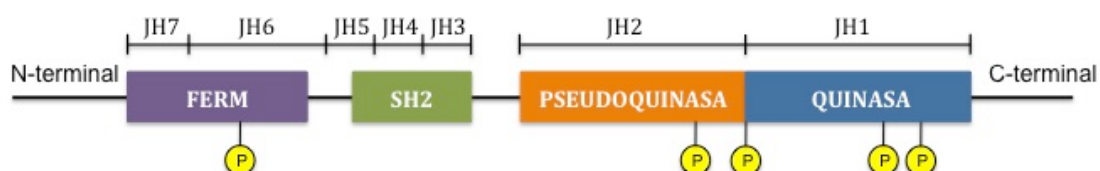


Figura 4: Representación esquemática de los dominios de las proteínas JAK. En la parte superior se representan los dominios bioquímicos y en bloques de color los dominios funcionales. En amarillo se muestran los sitios de fosforilación. Adaptada de Vainchenker y Constantinescu (Vainchenker and Constantinescu, 2013)

2.2.- Localización y función de las proteínas JAK

En mamíferos JAK1, JAK2 y TYK2 poseen una expresión ubicua, mientras que JAK3 se restringe predominantemente a células hematopoyéticas y está muy regulada por el desarrollo celular y la activación (Musso et al., 1995). A nivel subcelular se encuentran en el citosol, donde ejecutan su actividad tirosín-quinasa, pero también se pueden localizar en endosomas y la membrana plasmática, cerca de sus receptores específicos. Por último, también se ha descrito su localización en el núcleo celular, debido a su capacidad para fosforilar la histona H3 (Hurd et al., 2009).

El análisis fenotípico de ratones deficientes para los distintos JAKs ha sido fundamental para entender su papel fisiológico, y en todos los casos presentan deficiencias en señalización por citoquinas. Los ratones deficientes en JAK1 y JAK2 son letalmente embrinarios por defectos en motoneuronas (Rodig et al., 1998) o fallos en la eritropoyesis (Parganas et al., 1998, Neubauer et al., 1998) mientras que los ratones deficientes en JAK3 exhiben un fenotipo SCID (Nosaka et al., 1995). Los ratones deficientes en TYK2 conllevan hipersensibilidad frente a infecciones debido a la ausencia de respuesta inflamatoria (Karaghiosoff et al., 2000).

2.3.- Estructura de las proteínas STAT

En mamíferos existen 7 miembros: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b y STAT6. En su mayoría poseen una longitud de aproximadamente 750-800 aminoácidos, y mientras que STAT2 y STAT6 carecen de residuo serina en el extremo C-terminal, los otros miembros sí lo poseen (Duncan et al., 1997). Todos los STATs tienen en común una serie de dominios estructurales conservados, desde el extremo N-terminal hasta el C-terminal: dominio de interacción dímero-dímero, dominio hélice-hélice (*coiled-coil*), dominio de unión a ADN, dominio SH2 (*Src-homology 2*) y dominio de transactivación (Figura 5).

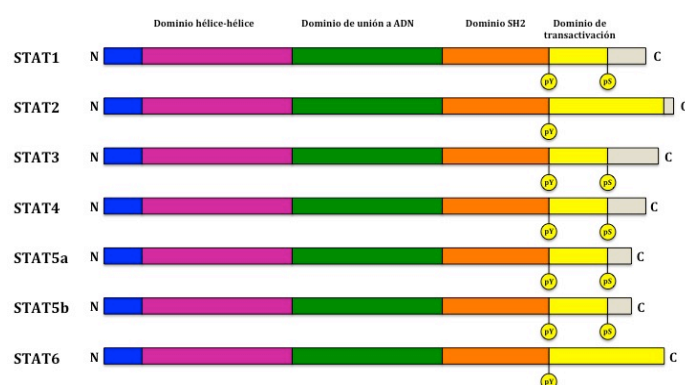


Figura 5: Representación esquemática de la estructura molecular de las proteínas STAT. Las proteínas STAT poseen varios dominios conservados. El extremo amino-terminal (N) representa el dominio hélice-hélice que participa en la dimerización, tras el cual poseen un dominio de unión a ADN. El dominio SH2 posee un residuo de tirosina (pY) cuya fosforilación permite la dimerización de los STATs. Excepto STAT2 y STAT6, el resto de proteínas de la familia posee un residuo de serina (pS) en el dominio de transactivación, cuya longitud es variable entre los miembros de la familia. Modificada de Yu y Jove (Yu and Jove, 2004).

El dominio de unión a ADN es estructuralmente parecido a los dominios de unión a ADN tipo inmunoglobulina, y reconoce dos tipos de motivos en el ADN: el motivo ISRE (*Interferon Stimulated Response Elements*, cuya secuencia de consenso es: AGTTTNCNTTTCC) y el motivo GAS (*Gamma-Activated Sequence*, cuya secuencia de consenso es: TTCNNNGAA) (Chen et al., 1998).

El dominio SH2 es el más altamente conservado y tiene como función unir la molécula de STAT al receptor fosforilado y a su vez ser fosforilado en residuos tirosina (Schindler, 2002). Esta fosforilación determina la dimerización mediante la interacción fosfotirosina-SH2 entre ambas moléculas de STAT y es determinante para formar la estructura tridimensional necesaria para unirse al ADN.

El dominio de transactivación posee residuos de serina que pueden ser fosforilados, de tal forma que son capaces de promover la actividad transcripcional y producir un aumento en la expresión génica (David et al., 1995b).

2.4.- Funciones de los STATs

Las funciones de cada miembro de esta familia han sido ampliamente estudiadas:

STAT1 se considera importante en señalización de interferones tipo I y II (Darnell et al., 1994). (Tanaka et al., 1998) También tiene funciones en la regulación de la apoptosis dependiente de TNF/caspasas (Tanaka et al., 1998).

STAT2 está implicada en la señalización de interferones (Darnell et al., 1994) y requiere de STAT1 y p48 para formar el complejo ISGF3 e interactuar con el ADN (Bluyssen and Levy, 1997).

STAT3 es activada por citoquinas que señalizan a través de receptores con la subunidad gp130. Tiene un papel esencial en la respuesta anti-inflamatoria inducida por IL-10 (Chapman et al., 1999). Su delección en distintos tipos celulares tiene efectos muy heterogéneos, aunque a nivel sistémico es letal embrionario (Takeda et al., 1997).

STAT4 está implicada en señalización vía IL-12 (Thierfelder et al., 1996) y producción de IFN- γ por parte de células no linfoides (Kaplan et al., 1996).

STAT5 presenta dos variantes como consecuencia de dos genes, *STAT5a* y *STAT5b*, con alta homología (96%) pero con funciones específicas para cada proteína. Los ratones deficientes en *STAT5a* presentan ausencia de desarrollo de la glándula mamaria dependiente de prolactina (Nakajima et al., 1997), mientras que los deficientes en *STAT5b* acusan un retraso en el dimorfismo sexual y defectos en la regulación de la expresión génica hepática dependiente de la

hormona de crecimiento, GH (*Growth Hormone*) (Udy et al., 1997). Los ratones deficientes en ambos genes son letales poco después de su nacimiento por defectos en la hematopoyesis (Teglund et al., 1998).

STAT6 es crítico en la diferenciación de linfocitos al tipo Th2. Regula la expresión de factores de transcripción GATA3 y c-Maf (implicados en la función Th2 y la remodelación de la cromatina en el locus IL-4) (Hou et al., 1994). Su deficiencia está asociada con un incremento de la respuesta inmune frente a tumores.

2.5.- Genes diana de los STATs

En la transducción de señales desde el exterior de la célula hasta el mismo núcleo el objetivo es poner en funcionamiento un programa genético específico para poder responder a los estímulos. En situación basal los mecanismos de transducción de señales están finamente regulados para garantizar una expresión génica adecuada, pero en el contexto patológico de STATs activados constitutivamente encontramos un aumento en la expresión de genes clave para iniciar o mantener la transformación celular. Los genes diana de STAT5 son especialmente interesantes porque son activados por la señalización de JAK2, y están implicados bien en ciclo celular o bien en apoptosis:

c-myc controla la diferenciación terminal del ciclo en estado post-mitótico (Yu and Jove, 2004) y se ha encontrado sobreexpresión de este gen en numerosas neoplasias humanas (Li and Dang, 1999). STAT3 y STAT5 son los encargados de regular el gen *c-myc* (Bromberg et al., 1999, Lord et al., 2000), y hay estudios con líneas celulares linfoides que demuestran que el uso de inhibidores específicos de BCR-ABL inhiben STAT5 y producen concomitantemente una regulación negativa de *c-myc* (Huang et al., 2002b).

CICLINA D1 regula la progresión en el ciclo celular asociándose con las quinasas dependientes de ciclina (CDK). La expresión de esta proteína se encuentra alterada en numerosas neoplasias debido a la activación constitutiva de diferentes factores de transcripción. Por ejemplo, las células que expresan STAT3C (Bromberg et al., 1999) también muestran elevados niveles de expresión de *Ciclina D1*. Otros estudios con modelos *in vitro* emplean dominantes negativos de STAT5 para confirmar que participa en la regulación de las *ciclinas D1* y *D2* (de Groot et al., 2000).

Los genes de la **familia *Bcl-2*** han demostrado jugar un papel extraordinariamente importante en la oncogénesis debido a su función antiapoptótica. *BCL-XL* es diana de STAT3 y STAT5 según varios estudios (Catlett-Falcone et al., 1999, Grandis et al., 2000). STAT5 puede conferir a las células resistencia a la apoptosis gracias al aumento en los niveles de BCL-XL (Socolovsky et al., 1999), y se ha demostrado que bloqueando la actividad de BCR-ABL en líneas celulares de

leucemia mieloide crónica se consigue suprimir la expresión de *BCL-XL* dependiente de STAT5 (Horita et al., 2000).

El gen *Cis*, cuyo producto proteico es miembro de la familia SOCS y por tanto regula la vía (como reseñamos más adelante), también es activado por un grupo de citoquinas que incluye IL-2, IL-3 y eritropoyetina (EPO) vía STAT5 (Matsumoto et al., 1997). Esta proteína contiene un dominio SH2 y es capaz de unirse a los receptores de EPO e IL-3, de forma que la expresión forzada de *Cis* en líneas celulares es capaz de suprimir la activación inducida por citoquinas de STAT5. Así, *Cis* posee un papel fundamental en la regulación de la vía puesto que modula positiva y negativamente la función de STAT5 (Matsumoto et al., 1997).

El gen *Osm* (*Oncostatin-M*) también fue identificado en este último trabajo aunque había sido previamente descrito como gen de respuesta temprana inducido por citoquinas a través de la vía JAK/STAT5 (Yoshimura et al., 1996).

Otro caso de regulador negativo de la vía que su vez es gen diana de STAT sería *Socs2*, cuya estructura proteica es similar a la de CIS (Endo et al., 1997, Starr et al., 1997). Se ha hipotetizado que actúa como regulador negativo en las vías GH-STAT5b e IGF-1 (Metcalf et al., 2000), aunque su papel fisiológico necesita ser aclarado con más profundidad. La expresión de *Socs2* sólo se induce por GH vía STAT5b (Greenhalgh et al., 2002).

2.6.- Regulación de la vía JAK/STAT

Existen varias familias de moléculas implicadas en los procesos de regulación de la vía de JAK/STAT:

SOCS (*supressors of cytokine signaling*) Es una familia de 8 miembros: CIS (*cytokine inducible SH2-domain protein*) y las proteínas SOCS1, SOCS2, SOCS3, SOCS4, SOCS5, SOCS6 y SOCS7, de las que sólo las cuatro primeras han sido ampliamente estudiadas. Su acción consiste en inhibir la vía JAK/STAT mediante el clásico mecanismo de retroalimentación negativa (Greenhalgh and Hilton, 2001). Pueden inhibir el estímulo de las citoquinas de varias maneras: SOCS1 puede unirse directamente a JAK a través del dominio SH2 (Endo et al., 1997, Naka et al., 1997); CIS compite con STAT por el sitio de unión en el receptor (Ram and Waxman, 2000); mientras tanto, SOCS3 requiere la unión al receptor de citoquinas activado (Nicholson et al., 2000). Por último, también pueden degradar proteínas de señalización via ubiquitinización-proteosoma (Zhang et al., 1999).

PIAS (*protein inhibitor of activated STAT*) Es una familia de 4 miembros: PIAS1, PIAS3, PIASX y PIASY. Poseen dominios que les permiten unirse a regiones de cromatina que interaccionan con la matriz nuclear, y pueden estar involucradas en la organización de la cromatina y la expresión

génica (Aravind and Koonin, 2000). La interacción de PIAS con STATs está gobernada con cierta especificidad (Greenhalgh and Hilton, 2001) y es dependiente del estímulo por citoquinas. Son varios los mecanismos de acción de esta familia: inhibición de la unión de STATs a ADN (Liu et al., 1998) o reclutamiento de histona-deacetilasas que actúan como moléculas co-represoras (Tussie-Luna et al., 2002).

Tirosín-fosfatasas: Son varias las proteínas fosfatasas que pueden defosforilar componentes activados de la vía JAK/STAT. Así, SHP-1 (**SH2 Protein-1**) es capaz de defosforilar tanto JAK2 (Klingmuller et al., 1995) como JAK1 (David et al., 1995a); SHP-2 estaría implicada en la defosforilación de JAKs y también de STATs a nivel citoplásmico (Wu et al., 2002); otras fosfatasas implicadas en la vía son CD45, PTP1B y TC45.

Modificaciones post-traduccionales: Tanto las proteínas JAK como las STAT pueden sufrir modificaciones post-traduccionales aparte de la fosforilación en tirosina. Así, JAK2 puede entrar en la vía de ubiquitinización-proteosoma tanto *in vitro* como *in vivo* (Ungureanu et al., 2002). Otras modificaciones que pueden sufrir estas proteínas son:

- Conjugación con ISG15 (**Interferon Stimulated Gene 15**) (Malakhova et al., 2003), que actúa por retroalimentación positiva.
- Metilación de residuos de arginina en STAT1, que incrementa su unión a DNA (Mowen et al., 2001).
- Acetilación por CBP/p300 de STAT6, que aumenta su actividad transcripcional (Shankaranarayanan et al., 2001).

2.7.- JAKs en situación patológica: mutaciones activadoras y proteínas de fusión

La desregulación de la vía JAK/STAT ha sido descrita en una gran variedad de enfermedades hematológicas y muy especialmente en patologías de estirpe mieloide. Estos eventos pueden tener un papel clave en los procesos de iniciación y progresión de las distintas enfermedades debido a que esta vía desarrolla un papel central en la señalización celular (Chen et al., 2012).

El desacoplamiento de la vía puede deberse a mutaciones o a reordenamientos del gen con otros genes. Las mutaciones descritas en la literatura se acumulan en el dominio pseudoquinasa, y una de las más importantes es la que convierte el residuo 617 de valina a fenilalanina: JAK2^{V617F} (James et al., 2005a, Kralovics et al., 2005, Levine et al., 2005, Baxter et al., 2005) que se ha asociado a neoplasias mieloproliferativas como policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (ET) y mielofibrosis (MF).

La PV es el resultado de una expansión clonal de un progenitor pluripotente comprometido a linaje mieloide que cursa con eritrocitosis, aumento de riesgo por trombosis, trombocitosis, leucocitosis y esplenomegalia (Levine and Gilliland, 2007).

La carga alélica de JAK2^{V617F} juega un papel crítico a la hora de determinar distintos fenotipos para la misma mutación, y tanto los modelos en ratones transgénicos como los casos clínicos apoyan el modelo de gen-dosis en el que altas cargas alélicas conllevan un fenotipo de policitemia vera (PV) mientras que una reducción de esa carga implicaría trombocitosis esencial (ET) (Levine and Gilliland, 2008). Se han descrito también distintos reordenamientos de JAK2 que resultan en proteínas de fusión tales como TEL-JAK2 (Peeters et al., 1997, Lacronique et al., 1997), PCM1-JAK2 (Reiter et al., 2005, Murati et al., 2005, Bousquet et al., 2005), SSBP2-JAK2 (Poitras et al., 2008) y SEC31A-JAK2 (Van Roosbroeck et al., 2011). Estas translocaciones producen neoplasias de estirpe linfóide y mieloide, y se han caracterizado funcionalmente de forma exhaustiva con objeto de determinar si en estos casos es adecuado el uso de inhibidores de tirosín-quinasa como terapia molecular dirigida (Pardanani, 2008).

Una de las más recientemente descritas es BCR-JAK2, fruto de una translocación t(9;22)(p24;q11) (Griesinger et al., 2005). Posteriormente se han descrito otros 7 casos con este gen de fusión (Cirmena et al., 2008, Lane et al., 2008, Impera et al., 2011, Elnaggar et al., 2012, Xu et al., 2013, Cuesta-Dominguez et al., 2012, Belleso et al., 2013), entre los que se incluye el descrito en este trabajo. Se han reseñado 5 tipos distintos de patología asociada a este reordenamiento, siempre de naturaleza hematopoyética: leucemia mieloide crónica atípica (2 casos), leucemia mieloide crónica (3 casos), leucemia mieloide aguda (1 caso), neoplasia mieloproliferativa (1 caso) y leucemia aguda linfoblástica (1 caso).

2.8.- Papel de los factores de transcripción STAT en la transformación celular y la oncogénesis

Aunque la vía JAK/STAT no interviene directamente en procesos moleculares asociados al cáncer tales como la reparación del ADN o la regulación del ciclo celular, sí tiene un papel en la oncogénesis debido al desacomplamiento que pueden producir los STATs en ésta y otras vías de señalización. Además los STATs también tienen un efecto en la prevención de la apoptosis, señalización de diversos factores de crecimiento y angiogénesis, procesos estrechamente ligados a la oncogénesis.

Conociendo el papel que tienen los STATs en la regulación de las funciones de las células hematopoyéticas es lógico pensar que un fallo en esta vía puede tener un profundo impacto biológico y conllevar el desencadenamiento de una neoplasia hematológica. STAT3 y STAT5 intervienen en el control de la hematopoyesis de diferentes formas:

- STAT3 es clave para la diferenciación de células mieloides (Minami et al., 1996).
- STAT5 también se ha relacionado con la diferenciación mieloide (Nosaka et al., 1999) de modo que su actividad antiapoptótica es clave en las últimas etapas de la diferenciación granulo-macrofágica.

La literatura publicada a este respecto pone de manifiesto varios escenarios que pueden desencadenar un proceso neoplásico en el compartimento hematopoyético:

- ACTIVACION CONSTITUTIVA DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN STAT

El estado de fosforilación de los STATs, y por tanto su activación, es limitado en condiciones fisiológicas. Sin embargo, se ha descubierto que en el contexto patológico están constitutivamente activos en el núcleo, alterando el programa génico de la célula tumoral. Esto se ha descrito fundamentalmente para STAT1, STAT3 y STAT5 (Buettnner et al., 2002).

STAT1 está constitutivamente activo en neoplasias hematológicas (Aronica et al., 1996, Kirito and Komatsu, 2002, Weber-Nordt et al., 1996).

La activación constitutiva de **STAT3** se descubrió en un trabajo (Bromberg et al., 1999, Sternberg and Gilliland, 2004) en el que una forma mutada llamada STAT3C era capaz de dimerizar en ausencia de fosforilación en tirosinas y así transformar fibroblastos en cultivo generando tumores en un modelo *in vivo*. Esta activación se ha descrito tanto en tumores sólidos como en leucemias y linfomas (Sternberg and Gilliland, 2004).

STAT5 tiene un papel fundamental en la patogénesis de leucemias y linfomas, donde se halla también constitutivamente activa (Benekli et al., 2003, Ward et al., 2000). Se han encontrado también varias formas recombinantes de STAT5 que contienen mutaciones activadoras que inducen proliferación celular independiente de citoquinas (Onishi et al., 1998).

- ACTIVACIÓN CONSTITUTIVA DE TIROSÍN-QUINASAS ONCOGÉNICAS

Las tirosín-quinasas activadas se encuentran entre las proteínas oncogénicas más frecuentes en células tumorales (Krause and Van Etten, 2005).

Una familia de tirosín-quinasas implicada en la activación constitutiva de las proteínas STAT es la de las Src quinasas. Se ha descrito la activación constitutiva de STAT3 en la línea fibroblástica de ratón NIH3T3 transformada por el oncogén v-Src (Yu et al., 1995). También se ha demostrado que JAK1 y Src colaboran para activar STAT3 en esa misma línea (Sinibaldi et al., 2000).

La familia de quinasas ABL (*Abelson leukemia protein*) también está implicada en la activación constitutiva de los STATs. STAT1 y STAT5 aparecen activados por v-ABL en linfocitos pre-B transformados (Danial et al., 1995, Danial et al., 1998), requiriendo la interacción con JAK1. Es interesante destacar que si se muta en v-ABL el dominio de interacción con JAK1 no se produce transformación (Danial et al., 1998).

También se pueden encontrar traslocaciones que implican a ABL, como la que fusiona con el gen BCR (*breakpoint cluster region*) en la translocación t(9;22) dando lugar al cromosoma Philadelphia (Ph'), presente en un altísimo porcentaje de pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) (Muller et al., 1991). Además se ha encontrado esta traslocación en pacientes con leucemia aguda linfoblástica (LAL) y en leucemia neutrofilica crónica (LNC). Aunque en principio se consideraba que el único papel de BCR era el que le confería su dominio de oligomerización (McWhirter et al., 1993), se han descrito otras funciones como su actividad quinasa (Maru and Witte, 1991), además de la existencia de un dominio de unión a factores de intercambio de guanina (GEF, *guanine nucleotide exchange factor*) que permite su interacción con proteínas como CDC42, DBL y VAV (Ron et al., 1991, Adams et al., 1992). Dependiendo del punto de rotura del gen BCR pueden generarse tres proteínas de distintos pesos moleculares: p210, p230 y p190 (Figura 6).

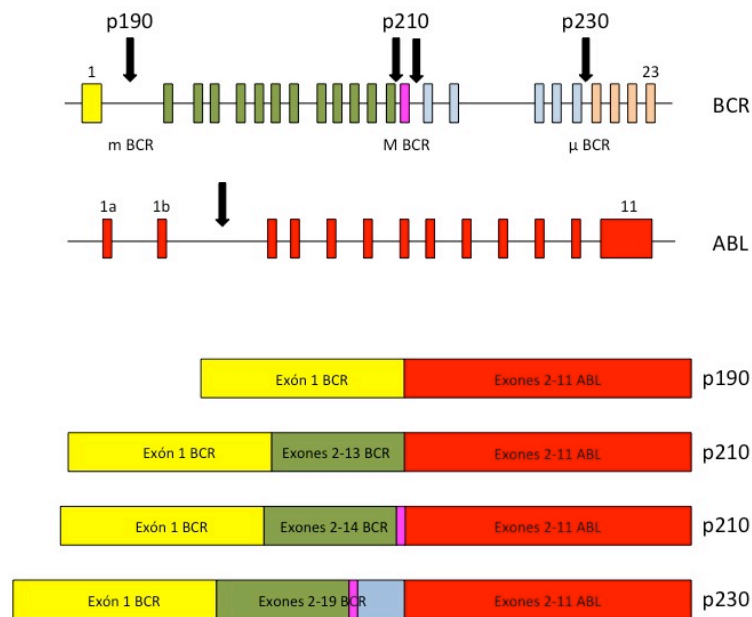


Figura 6: Representación esquemática de los puntos de rotura de BCR y los exones que dan lugar a las proteínas BCR-ABL^{p190} (m BCR), BCR-ABL^{p210} (M BCR) y BCR-ABL^{p230} (μ BCR). El punto de rotura en ABL es único y conserva los exones 2-11 en las tres isoformas.

BCR-ABL^{p210} y BCR-ABL^{p190} son capaces de fosforilar en tirosina a STAT5, y en menor medida STAT1 y STAT3 (Ilaria and Van Etten, 1996). La interacción entre BCR-ABL y STAT5 se ha demostrado mediante delecciones en los dominios SH2 y SH3 de BCR-ABL que impiden la activación de STAT5 (Klejman et al., 2002). En otros trabajos se hace uso de dominantes negativos de STAT5 o inhibidores selectivos de BCR-ABL en líneas celulares transformadas por esta fusión génica, de manera que disminuyen el

crecimiento y la viabilidad celular (de Groot et al., 1999, Huang et al., 2002a). BCR-ABL^{p230} es una variante muy poco frecuente que se ha asociado a leucemia mieloide crónica neutrofílica (LMC-N) (Pane et al., 1996).

3.- Inhibidores de tirosín-quinasa: inhibidores específicos de JAK

Como hemos visto, las proteínas JAK están muy implicadas en procesos de transformación y leucemogénesis, lo que ha motivado la búsqueda de inhibidores tirosín-quinasa cada vez más potentes y altamente selectivos para estas proteínas.

Esta línea de investigación farmacológica ha dado muy buenos resultados en los últimos años en los que ha aparecido una gran batería de compuestos con altas tasas de inhibición y de los cuales muchos ya están en fases avanzadas de investigación clínica en humanos.

Nombre	Fase de desarrollo clínico	IC ₅₀ (nM)	Indicación	Referencia
Ruxolitinib (INCB018424)	Aprobado por FDA Fase III	JAK1 (2,7) JAK2 (4,5) JAK3 (322)	PMF, PV, ET, leucemia	(Verstovsek et al., 2010) (Mesa et al., 2013)
Tofacitinib	Fase III	JAK3 (1)	Enfermedades reumáticas y autoinmunes	(Burmester et al., 2013)
AZD1480	Fase I/II	JAK2 (0,26)	PMF, PV, ET, MF	(Plimack et al., 2013)
CYT387	Fase I/II	JAK1 (11) JAK2 (18)	PMF, post-PV, ET, MF	(Pardanani et al., 2013)
TG101209	-	JAK2 (6)		(Pardanani et al., 2007a) (Sun et al., 2011)
BMS-911543	Fase I/II	JAK2 (1,1)	MF	(Purandare et al., 2012)
Baricitinib (INCB028050)	Fase III	JAK1 (5,9) JAK2 (5,7)	Artritis reumatoide	(Fridman et al., 2010)

Tofacitinib (CP-690550, Tasocitinib)	Fase III	JAK3 (1)	Enfermedades reumáticas y autoinmunes	(West, 2009)
TG101348 (SAR302503)	Fase I/II	JAK2 (3)	PMF, leucemia mastocítica	(Pardanani et al., 2011)
NVP-BSK805	Preclínica	JAK2 (0,5)	PV	(Baffert et al., 2010)
AZ 960	Fase II	JAK2 (<3)		(Yang et al., 2010)

Tabla 1: Relación de inhibidores de JAKs. Se muestra para cada inhibidor el estado de desarrollo de investigación clínica, las constantes de inhibición para cada proteína específica, la indicación y la bibliografía correspondiente. FDA: *Food and Drug Administration*; PMF: mielofibrosis primaria; PV: policitemia vera; MF: mielofibrosis; ET: trombocitemia esencial.

El desarrollo de inhibidores específicos de tirosín-quinasa no siempre ha sido tan prolífico como hoy en día, ya que en los comienzos se pensaba que no serían buenas dianas terapéuticas por el hecho de que el dominio quinasa está conservado y que la mayoría de inhibidores compiten por el sitio activo de ATP. Sin embargo, han resultado ser excelentes dianas y la FDA (*Food and Drug Administration*) ya ha aprobado el uso de 13 de los mismos.

Estos compuestos no afectan únicamente a una quinasa, sino que en mayor o menor medida también actúan sobre otras moléculas con distintas constantes de inhibición (Verstovsek, 2010). De igual forma Imatinib (o STI571/Gleevec), el tratamiento estándar para la LMC BCR-ABL⁺, consigue la remisión en el 90% de los pacientes (Schindler et al., 2000, Druker et al., 2006) pero además de inhibir la actividad quinasa de ABL también tiene efecto sobre PDGFR-quinasa y el receptor tirosín-quinasa KIT (Druker and Lydon, 2000, Buchdunger et al., 2000). Aún así, Imatinib supuso una revolución en cuanto a terapias moleculares dirigidas y hoy en día están surgiendo multitud de compuestos destinados a inhibir JAK2, lo que supone una nueva forma de abordar el tratamiento de las neoplasias provocadas por la desregulación de esta proteína.

El uso de Tofacitinib como fármaco inmunomodulador ha sido validado en modelos de trasplante de ratón y primate (Changelian et al., 2003, Kudlacz et al., 2004) y modelos de artritis reumatoide (AR) (Milici et al., 2008). Debido a que bloquea la señalización de varias citoquinas, es capaz de frenar la diferenciación de linfocitos Th1, Th2 y Th7 (Ghoreschi et al., 2003, Kudlacz et al., 2008, Rosengren et al., 2012).

Ruxolotinib, que inhibe JAK1 y JAK2, ha resultado muy beneficioso en un ensayo clínico con pacientes con AR y otras enfermedades autoinmunes (Moreland et al. 2008). En pacientes con mielofibrosis reduce la esplenomegalia y produce una mejora sistémica de la enfermedad (Quintas-Cardama and Verstovsek, 2011).

TG101209 es un potente y altamente selectivo inhibidor de JAK2, y ha sido validado en líneas celulares de síndrome mieloproliferativo asociados a las mutaciones JAK2^{V617F} y MPL^{W515L/K} (Pardanani et al., 2007b) y en líneas celulares de mieloma múltiple (Ramakrishnan et al., 2010). También ha resultado efectivo en modelos de cáncer de pulmón debido a que inhibe la señalización de STAT3 y se postula como co-tratamiento junto con la radioterapia (Sun et al., 2011).

TG101348 se encuentra en Fase II/III de estudio clínico en pacientes con mielofibrosis (Santos and Verstovsek, 2011) y su eficacia terapéutica ha quedado demostrada *in vitro* (Lasho et al., 2008) e *in vivo* (Wernig et al., 2008).

En la actualidad hay otros tantos compuestos en distintas fases de estudio, y queda claro que los inhibidores de JAKs tienen un gran potencial para una variedad de enfermedades tanto hematológicas como autoinmunes.

4.- Modelos animales en oncogénesis

Los modelos de enfermedad humana en ratón se han convertido en herramientas fundamentales en investigación biomédica con objeto de desvelar los mecanismos moleculares que subyacen en condiciones patológicas, así como para comprobar *in vivo* los efectos de una función génica aberrante. Aunque existen modelos con líneas celulares, estos no recapitulan todas las características que hacen falta para comprender la patofisiología de estos trastornos. En el campo de las patologías hematológicas este modelaje ha alcanzado mayor importancia debido a la alta caracterización molecular de muchas enfermedades ligadas al sistema hematopoyético.

Las neoplasias mieloproliferativas, muchas de las cuales se caracterizan por la falta de regulación de tirosín-quinetas, son buenas candidatas para generar modelos animales debido a su conocida actividad catalítica. Existen 3 abordajes distintos para modelar una enfermedad del sistema hematopoyético: transgénesis, xenotrasplantes y transducción retroviral de progenitores hematopoyéticos seguida de trasplante.

4.1.- Modelos transgénicos

Una de las mayores ventajas de esta aproximación es la expresión del transgén a niveles cuasi-fisiológicos dependiendo de la secuencia promotora que se utilice. Esto resulta muy valioso en casos como JAK2, ya que hay estudios que indican que JAK2^{V617F} debe asociarse a un receptor de citoquinas de tipo I (EpoR o MPL) para señalizar (Lu et al., 2005).

El primer modelo transgénico para BCR-ABL se desarrolló en 1990 con la variante P210, y se comprobó que los ratones transgénicos morían de leucemia aguda (mieloide/linfoide) entre los 10 y los 58 días de vida (Heisterkamp et al., 1990). Más tarde se han incorporado mejoras desarrollando modelos que expresan BCR-ABL bajo el control de distintos promotores inducibles y secuencias potenciadoras de la transcripción (*enhancers*) (Heisterkamp et al., 2000, Honda et al., 1995, Huettnner et al., 2000, Voncken et al., 1992, Voncken et al., 1995). También se han desarrollado múltiples modelos de síndrome mieloproliferativo inducido por JAK2^{V617F} (Lacout et al., 2006, Wernig et al., 2006, Zaleskas et al., 2006, Bumm et al., 2006). El primer modelo de síndrome mieloproliferativo realizado por el grupo de Skoda y colaboradores concluyó que al igual que en los pacientes, existe una correlación entre los niveles de expresión de la mutación JAK2^{V617F} y el fenotipo: una baja expresión producía un fenotipo de trombocitemia esencial, mientras que altos niveles de expresión favorecían la manifestación de policitemia vera (Tiedt et al., 2008).

Para eludir los problemas generados por la variabilidad que produce el sitio de inserción del transgén se han desarrollado sistemas *knock-in* en los cuales la mutación se introduce en el locus de JAK2 con el objetivo de que se exprese de forma fisiológica (Li et al., 2010, Marty et al., 2010, Mullally and Ebert, 2010).

4.2.- Modelos de trasplante de médula ósea transducida con vectores retrovirales

La LMC humana ha sido fielmente reproducida en ratón gracias al modelo de transducción retroviral de progenitores hematopoyéticos de médula ósea con el transgén BCR-ABL seguida de trasplante en receptores singénicos letalmente irradiados (Daley et al., 1990, Kelliher et al., 1990). Este abordaje ha permitido mimetizar el síndrome mieloproliferativo similar a la LMC en sólo 4 semanas usando sobrenadantes retrovirales con alta capacidad infectiva (Li et al., 1999, Pear et al., 1998, Zhang and Ren, 1998). Estos modelos reproducen características clínicas típicas de la enfermedad humana tales como la expansión policlonal de células mieloides inmaduras que expresan el transgén y son capaces de infiltrar bazo, hígado y pulmón. Esta enfermedad se puede trasplantar eficazmente en médula ósea o bazo de receptores secundarios, de forma que el proceso leucémico evoluciona a un proceso agudo mieloide o linfoide, denominado crisis blástica (Daley et al., 1991, Pear et al., 1998).

Este modelo ha sido utilizado también para determinar el fenotipo producido por reordenamientos de JAK2 y caracterizar la patología asociada, como es el caso de TEL-JAK2 (Carron et al., 2000, dos Santos and Ghysdael, 2006).

Las ventajas de este método son múltiples:

- Permite analizar *in vivo* la **función** de un oncogén.

- Posibilita comprobar el potencial de un oncogén en fondos genéticos distintos que tengan mutadas determinadas **dianas**.
- **Mimetiza la mutación somática** que ocurre en el paciente y afecta a un número limitado de células hematopoyéticas.

No obstante, este método también cuenta con algunas desventajas:

- **Variabilidad:** la heterogeneidad de tipos celulares transformados tras la transducción, la difícil reproducibilidad de cada individuo (tiene que ser generado *de novo* cada vez) y la dificultad para obtener títulos virales altos con transgenes que pueden resultar tóxicos o de gran tamaño para la línea de células productoras.
- **Inmunosupresión:** debido a que los animales receptores deben ser irradiados para eliminar las células de médula ósea endógena y facilitar el injerto, no se pueden estudiar los efectos del sistema inmune del receptor ni una posible inmunoterapia.

A pesar de las limitaciones de cualquier diseño experimental *in vivo* esta aproximación constituye un método preciso, eficaz y reproducible para modelar la enfermedad hematopoyética humana en ratón.

4.3.- Modelos de xenotrasplante

Durante la pasada década el trasplante de células leucémicas humanas en ratones con diferentes niveles de inmunodeficiencia ha representado un método muy valioso para estudiar la biología de la leucemia, identificar grupos de riesgo candidatos a nuevas estrategias terapéuticas y amplificar las células leucémicas humanas *in vivo*.

El primer trabajo con xenotrasplantes surgió tras la identificación de una mutación que conllevaba una inmunodeficiencia severa combinada (*severe combined immunodeficiency*, SCID) y que permitió trasplantar células humanas en los receptores inmunodeficientes sin provocar rechazo del injerto (Bosma et al., 1983). Sin embargo, estos ratones seguían teniendo cierta inmunidad, lo que entorpecía el injerto, de modo que al cruzar ratones SCID con ratones NOD/Lt (*non-obese diabetic*) se obtuvo una cepa con menor capacidad inmune y por tanto más permisiva con los injertos: NOD/SCID (Shultz et al., 1995). En este modelo se han conseguido injertar con éxito células de leucemia aguda linfoblástica (LAL) generando un modelo que reproduce el curso de la enfermedad en los pacientes (Lock et al., 2002, Baersch et al., 1997). Recientemente se han desarrollado modelos que carecen de inmunidad innata y respuesta de células NK (*natural killer*) cruzando la cepa NOD-SCID con una cepa que presenta defectos en la cadena gamma del receptor de IL-2: NSG (Shultz et al., 1995) y NOG (Ito et al., 2002). Estas cepas permiten injertos muy elevados de células hematopoyéticas humanas así como la diferenciación de las CMHs trasplantadas debido a la ausencia casi total de sistema inmune. Sin embargo, el cuadro clínico

leucémico en los xenotrasplantes no sólo viene determinado por la cepa receptora sino que intervienen otros factores:

- La fuente y el procesamiento de las células leucémicas
Las células congeladas necesitan tiempos de latencia más largos en comparación con células recién aisladas del paciente (Meyer et al., 2011, Malaise et al., 2011). La vía de inyección de las células también ha resultado ser determinante: se consiguen mejores injertos inyectando las células directamente en la médula ósea, ya que se evita el proceso de migración de las células a su nicho cuando se inyectan por vía intravenosa de forma sistémica (Mazurier et al., 2003).
- El protocolo de trasplante y el acondicionamiento del receptor
Se ha demostrado que la irradiación subletal produce una mejora en el injerto, aunque puede tener un efecto negativo en la migración de células de LAL a su nicho en la médula ósea (Spiegel et al., 2004).
- La cepa receptora
La edad y el sexo también parecen ser clave en el éxito del trasplante. Así, los ratones más jóvenes consiguen injertar mejor (Ballen et al., 2001) e incluso se han usado ratones recién nacidos para esquivar la respuesta inmune innata (Kong et al., 2008). Por otro lado, las hembras han demostrado injertar hasta 10 veces mejor que los machos (Notta et al., 2010).

Dada la variedad de cepas receptoras resulta obvio apuntar que ésta ha de elegirse en función del objetivo experimental. En caso de necesitar altas tasas de injerto y/o amplificación de las células leucémicas, será conveniente usar un modelo más permisivo. Por otro lado, es importante recordar que en situación fisiológica las células leucémicas del paciente están en contacto con el microambiente (citoquinas y células del sistema inmune) y sometidas a presión selectiva, por lo cual parece crucial escoger un modelo con mayor capacidad del sistema inmune.

Estos modelos también presentan algunas contras, como la dificultad de emular lo que ocurre en el paciente, y que en muchos casos la enfermedad modelada no conlleva la muerte del animal. Sin embargo, representan una opción eficaz a la hora de modelar la enfermedad hematopoyética humana.

OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo de investigación ha sido el estudio y la caracterización tanto *in vitro* como *in vivo* de las posibles propiedades oncogénicas de una nueva proteína quimérica, BCR-JAK2, obtenida de un paciente con leucemia aguda linfoblástica (LAL).

Con la intención de resolver esta hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

- Clonar el ADNc de BCR-JAK2 a partir de una muestra de médula ósea del paciente con LAL con objeto de generar una línea de expresión estable para determinar su acción *in vitro*.
- Diseñar y poner a punto una técnica de diagnóstico molecular y de seguimiento de la enfermedad mínima residual del paciente que porta la translocación.
- Caracterizar el mecanismo de acción de la proteína: determinar su posible activación por fosforilación constitutiva y dilucidar qué moléculas de la vía de JAK/STAT están implicadas como efectoras, así como los genes diana activados en consecuencia.
- Determinar la eficacia de un nuevo y selectivo inhibidor de JAK2 (TG101209) en el modelo celular experimental que expresa de forma estable BCR-JAK2.
- Evaluar la capacidad de esta proteína de provocar una neoplasia hematológica *in vivo*, mediante el desarrollo de un modelo animal de trasplante de progenitores de médula transducidos con un vector retroviral que expresa BCR-JAK2.
- Caracterizar la enfermedad generada en el modelo de ratón mediante el estudio de la tasa de supervivencia, período de latencia, fenotipo macroscópico así como otros aspectos celulares y moleculares de la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Descripción del caso clínico

El paciente, un varón de 58 años de edad, presentaba astenia, dolor abdominal y hepatoesplenomegalia. Los valores de parámetros bioquímicos y conteo hematológico se muestran en la Tabla 1. El inmunofenotipo de la biopsia de médula ósea reveló la presencia de linfoblastos de tipo B (CD34⁺, CD19⁺, CD10⁺, MPO⁻, CD79a⁺, HLA-DR⁺, Tdt⁺, CD22⁺, CD24⁺). El cariotipo del aspirado medular mostró el siguiente resultado en 24 de 25 metafases analizadas: 49XY,+X,+2,+4,-9,-11,+19,add(19)(q13),+20,-22,+mar (cariotipo complejo).

En base a estas pruebas preliminares, se realizaron sendas hibridaciones *in situ* de fluorescencia (FISH) para detectar posibles reordenamientos de los genes BCR-ABL y MLL.

El paciente fue diagnosticado de una leucemia aguda linfoblástica (LAL) en estadio pre-B y comenzó el protocolo de tratamiento estándar de alto riesgo, consistente en quimioterapia: prednisona oral 130 mg/día y 4 dosis de vincristina y daunorubicina. Después de cinco semanas se logró la remisión hematológica, citogenética y molecular completa del paciente, y el tratamiento prosiguió a través de cuatro ciclos de consolidación estándar (vinblastina-26, citarabina y L-asparaginasa) seguidos de un trasplante autólogo de células madre previo acondicionamiento con ciclofosfamida e irradiación total (12 Gy). Como terapia antileucémica de mantenimiento se le administró interferón- α en baja dosis durante los 5 meses posteriores al trasplante. Más de ocho años después del diagnóstico, el paciente sigue en remisión completa.

BIOQUÍMICA	Valor
Hb (g/dL)	10,9
Contaje plaquetario (células/mm ³)	41x10 ³
Contaje leucocitario (células/mm ³)	10,8x10 ³
Linfocitos (%)	38
Monocitos (%)	6
Mielocitos/Metamielocitos (%)	4
Linfoblastos (%)	58

Tabla 1: Valores bioquímicos y hematológicos de la sangre periférica del paciente al diagnóstico.

El paciente firmó por escrito un consentimiento informado previo a la obtención de biopsia de médula ósea. Este protocolo se llevó a cabo de acuerdo con la legislación española vigente en cuanto a investigación clínica en humanos, y fue aprobada por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario de la Princesa (ref. PI-424).

2.- Animales de experimentación

Todos los animales de experimentación se han mantenido en las instalaciones del Animalario del CIEMAT de acuerdo con los procedimientos recomendados por FELASA (*Federation of European Laboratory Animal Science Associations*). Los experimentos se realizaron siguiendo la legislación europea y española vigente sobre uso y tratamiento de animales de experimentación (Ley 32/2007 y R.D. 1201/2005 del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente y Convenio Europeo ETS 1-2-3) y de acuerdo con los principios éticos y de bioseguridad del Comité Ético de uso y cuidados animales del Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT) (ref. HEM-04).

Los ratones se dispusieron en jaulas con capacidad para 5 animales situadas en una habitación termorregulada a 18 °C, con una humedad del 60% y unas condiciones de luminosidad de 12h de luz (7:00 – 19:00) y 12h de oscuridad (19:00 – 7:00). Se suministró dieta en pienso seco y agua *ad libitum*.

En los experimentos de trasplante de médula ósea se han empleado un total de 42 ratones de la cepa Balb/c que han sido criados y mantenidos por el personal del Animalario en las condiciones anteriormente descritas. Por otro lado se emplearon un total de 10 ratones de la cepa Balb/c OlaHsd-Foxn1^{nu/nu} para los estudios de tumorigénesis, suministrados por Harlam Ibérica y Janvier Labs y mantenidos en jaulas con aire tratado con filtros HEPA y con suministro de agua y pienso seco autoclavados.

3.- Líneas celulares y reactivos

En este trabajo de investigación se han empleado tanto líneas celulares humanas como células hematopoyéticas de ratón.

3.1.- Líneas celulares humanas y de ratón

La línea celular embrionaria de riñón humano HEK293T se obtuvo a través de la *American Type Culture Collection* (ATCC®, CRL-3216™) y se mantuvo en cultivo con medio *Dulbecco's Eagle modified medium* (DMEM, GIBCO Life Technologies) y 10% suero fetal bovino (LONZA), 100 U/mL de penicilina (GIBCO), 100 µg/ml estreptomicina (GIBCO), 50 µg/ml gentamicina (GIBCO) y 5 mM L-glutamina (GIBCO) a 37 °C y 5% CO₂. Esta línea se usó:

- en transfecciones transitorias para comprobar la expresión del transgén BCR-JAK2.

- como línea empaquetadora para producir sobrenadantes retrovirales.

La línea epitelial de riñón humano Nxe (Phoenix-ECO) fue amablemente cedida por el laboratorio del doctor Helmut Hanenberg . Esta línea se usó como empaquetadora de partículas virales ya que expresa las proteínas gag, pol y env de la envuelta ecotrópica. Estas células se cultivaron en botellas medianas recubiertas con gelatina 0,1% en medio DMEM suplementado con GlutaMAX (GIBCO Life Technologies), 10% suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/ml estreptomycin y 5 mM L-glutamina a 37 °CC y 5% CO₂.

Las líneas celulares humanas de fibrosarcoma HT1080 y células HeLa fueron obtenidas a través de la *American Type Culture Collection* (ATCC®, CRL-12012™ y CCL-2™). Estas líneas se usaron para la titulación de los sobrenadantes virales con envuelta VSV-G y se cultivaron en *Iscove's modified Dulbecco's medium* (IMDM, GIBCO Life Technologies) suplementado con 10% suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/ml estreptomycin, 50 µg/ml gentamicina y 4 mM L-glutamina a 37 °C y 5% CO₂ en placas p24 (Nunc, Roskilde, Dinamarca). Para titular sobrenadantes virales con la envuelta ecotrópica se usó la línea de fibroblastos de ratón NIH3T3 (ATCC®, CRL-1658™) y se cultivaron en DMEM suplementado con 10% suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/ml estreptomycin, 50 µg/ml gentamicina y 4 mM L-glutamina a 37 °C y 5% CO₂ en placas p24.

3.2.- Células hematopoyéticas de ratón

Las células progenitoras de médula ósea de ratón Lin⁻ se obtuvieron de ratones Balb/c macho de 8-12 semanas de edad. Las células de médula ósea se recogieron por perfusión de tibias y fémures con IMDM y una aguja de 25 gauge. Posteriormente se separaron por selección inmunomagnética negativa con el kit MACS Lineage Cell Depletion (Miltenyi Biotec). Para ello, se lavaron las células en PBE (PBS 1% BSA, 2mM EDTA) y se contaron en cámara de Neubauer con solución Turk (2% ácido acético, 0.01% azul de metileno en H₂O destilada) para eliminar células enucleadas. Posteriormente se procedió al marcaje con cocktail de anticuerpos de linaje conjugados a biotina (CD5, CD45R, CD11b, Anti-Gr-1, 7-4 y Ter-119) y perlas magnéticas conjugadas a estreptavidina, pasando posteriormente las células por un filtro de nylon de 30 µm para evitar la formación de agregados. Después se realizó la selección magnética utilizando una columna LS y una columna MS, y se volvieron a contar las células purificadas en cámara de Neubauer con solución Turk. Se comprobó por citometría de flujo que más del 90% de las células recién purificadas eran Lin⁻ y posteriormente se sembraron y pre-estimularon durante 48h en IMDM suplementado con 20% suero fetal bovino, 100 ng/µL mSCF y 100 ng/µL hIL-11, tal y como describieron Río y colaboradores (Río et al., 2002).

La línea celular de pro-linfocitos B de ratón Ba/F3 fue amablemente cedida por la Dra. Leonor Kremer (CNB-CSIC, Madrid) y se cultivó en DMEM suplementado con GlutaMAX (GIBCO Life

Technologies) suplementado con 10% suero fetal bovino, 10 ng/mL IL-3 recombinante de ratón (R&D, Minneapolis), 100 U/mL de penicilina y 100 µg/ml estreptomicina a 37 °C y 5% CO₂. La línea celular Ba/F3 transducida establemente con la construcción TEL-JAK2 (independiente de IL-3) fue amablemente cedida por el Dr. Gary Reuther (Florida University, Tampa, USA). Esta línea se sembró a 300.000 células/mL y cuando alcanzó una densidad de aproximadamente 1x10⁶ células/mL se le dio un pase 1/3 para mantenerla en cultivo.

3.3.- Ensayos de proliferación y de cinética dosis-respuesta

Los ensayos de proliferación de la línea Ba/F3 se realizaron cultivando las líneas celulares Ba/F3 control y Ba/F3 BCR-JAK2 en placas p-24, en presencia y ausencia de IL-3 (10 ng/mL) y contadas diariamente en cámara Neubauer por el método de exclusión con azul tripano. Los ensayos de proliferación de progenitores hematopoyéticos de ratón (Lin⁻) se realizaron cultivando estas células en placas p-6 en medio IMDM 20% suero fetal bovino, 100 ng/µL mSCF y 100 ng/µL hIL-11.

El inhibidor de JAK2 TG101209 fue suministrado por el Dr. Fuller (TargeGen Inc., San Diego, CA, USA) en base a un acuerdo de transferencia de material (MTA). Las soluciones de almacenaje (*stock*) se prepararon en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 10mM.

Los ensayos de cinética dosis-respuesta para el inhibidor TG101209 se diseñaron haciendo diluciones seriadas del fármaco en DMSO y tratando las células Ba/F3, plaqueadas en p24 a una densidad de 300.000 células/mL, con las distintas concentraciones del fármaco durante 24h. Después se marcaron con anexina-V (Sigma-Aldrich) conjugada con ficoeritrina para determinar la apoptosis por citometría de flujo y se calculó la concentración de fármaco necesaria para conseguir un 50% de células viables en el cultivo (IC₅₀). Como control se usaron alícuotas de DMSO diluido en medio DMEM.

Todos los cultivos de líneas celulares se han mantenido en el Laboratorio de Cultivos con nivel de seguridad P2, excepto las líneas empaquetadoras de retrovirus y las células en proceso de transducción retroviral, que han sido cultivadas y mantenidas en un Laboratorio de Cultivos con nivel de bioseguridad P2+. Toda la manipulación se ha realizado en cabinas de seguridad biológica de clase II.

4.- Construcciones de plásmidos y vectores retrovirales

Para realizar experimentos de expresión transitoria en células HEK293T, el ADNc de BCR-JAK2 se subclonó en el vector de expresión pcDNA3.1 (Invitrogen) a través de un sitio de restricción para *EcoRI*.

Para los experimentos de expresión estable por transducción retroviral en células Ba/F3 el ADNc de BCR-JAK2 fue clonado en el sitio de restricción *EcoRI* del vector retroviral pLZR-CMV-IRES-EGFP (Abad et al., 2002) para obtener el vector pLZR-BJ-IRES-EGFP (pLZR-BJ). El vector pLZR-IRES-EGFP se usó como control en todos los experimentos. Todas las construcciones fueron verificadas por secuenciación de ADN.

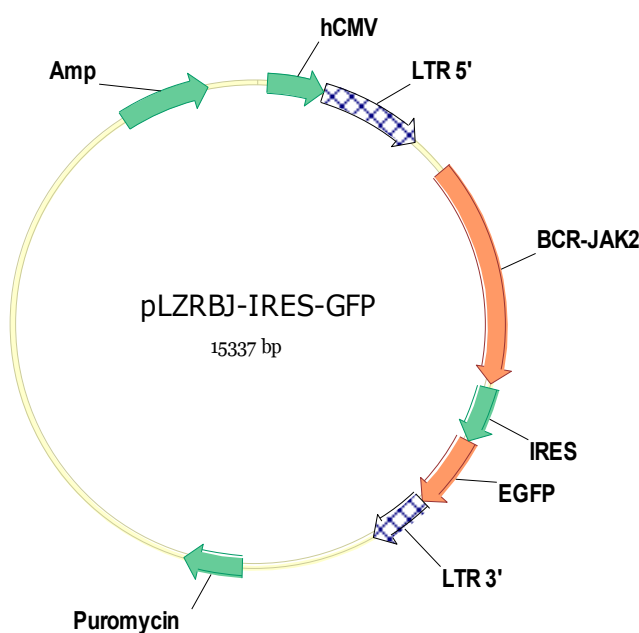


Figura 7: Representación esquemática del plásmido retroviral pLZR-BJ-IRES-EGFP usado como vector de transferencia.

Este plásmido posee el gen de resistencia a ampicilina, el promotor de citomegalovirus humano (hCMV), un sitio de entrada interna para el ribosoma (*Internal Ribosome Entry Site*, IRES) que permite hacer construcciones bicistrónicas, el gen de la proteína verde fluorescente amplificada (*Enhanced Green Fluorescent Protein*, EGFP) y un gen de resistencia a puomicina. El promotor de hCMV sólo funciona durante el estadio episomal, ya que la integración del provirus se hace por recombinación homóloga de las terminaciones largas repetidas (*Long Terminal Repeat*, LTR) y es la LTR en 5' la que dirige la expresión estable de los transgenes BCR-JAK2 y EGFP.

5.- Transfecciones transitorias en la línea celular HEK293T

Las transfecciones transitorias en la línea celular HEK293T se realizaron usando lipofectina (Invitrogen). Para ello se sembraron en placas p6 200.000 células en 2 mL de medio DMEM suplementado con 10% suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/ml estreptomicina, 50 µg/ml gentamicina y 4 mM L-glutamina. Después se diluyeron 2 µg de ADN plasmídico en Opti-MEM (Lonza, Basel) sin suero por un lado, y 15 µg de lipofectina en 100 µL de Opti-MEM sin suero en otro tubo. Se dejaron incubar estas premezclas durante 45' y pasado este tiempo se mezclaron los dos tubos y se dejó incubar durante 15' para la formación de complejos. Después se lavaron las células y se añadieron 0,8 mL de Opti-MEM (GIBCO Life Technologies) sin suero a la mezcla de complejos ADN-lipofectina. Finalmente se añadió la mezcla a las células y se dejó incubando durante 6h a 37 °C y 5% CO₂. Transcurridas las 6h se cambió el medio por DMEM 10% suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/ml estreptomicina, 50 µg/ml gentamicina y 4 mM L-glutamina y se dejó incubando a 37 °C y 5% CO₂. La expresión se determinó 48h después por citometría de flujo con un equipo Coulter EPIC-XL.

6.- Producción de sobrenadantes retrovirales

Para la obtención de sobrenadantes con partículas retrovirales infectivas hemos usado las líneas empaquetadoras de partículas retrovirales HEK293T y Nxe.

Los sobrenadantes retrovirales para las transducciones de la línea celular Ba/F3 se generaron por cotransfección transitoria de células 293T con los siguientes plásmidos que proporcionan los elementos necesarios para la encapsidación y producción de las partículas retrovirales:

- Plásmidos de transferencia **pLZR-IRES-EGFP** ó **pLZR-BJ-IRES-EGFP**.
- Plásmido de la envuelta **pMD2.VSV.G**: obtenido a través de Plasmid Factory (Bielefeld, Alemania), contiene una secuencia que codifica para la glicoproteína G de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular (VSV).
- Plásmido de empaquetamiento **CMV-gp**: obtenido del laboratorio del Dr. Baum (Hannover Medical School, Alemania), expresa los genes *gag* y *pol*, necesarios para el empaquetamiento y encapsidación de las partículas retrovirales.

En cada transfección se usaron 10 µg del vector de transferencia (pLZR-IRES-EGFP ó pLZR-BJ-IRES-EGFP). Las células HEK293T se sembraron a una densidad de $4,5 \times 10^6$ células en placas p100 con 10 mL de medio DMEM+GlutaMAX, 10% suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/ml estreptomicina a 37 °C y 5% CO₂. Después de 24h y habiendo alcanzado una

confluencia del 60-70% se procedió a la transfección con FuGene 6 Transfection Reagent (Roche), un agente de transfección basado en la introducción de ADN en la célula a través de su unión a lípidos. Para ello, se mezclaron el reactivo y medio sin suero y después se añaden los 10 µg de plásmido. Se deja incubar para permitir la formación de complejos y finalmente se añade la mezcla a las placas. Al día siguiente se cambió el medio por IMDM suplementado con 10% suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL estreptomicina y se incubaron a 37 °C y 5% CO₂. A las 24 y 48h después del cambio de medio se recogieron los sobrenadantes con las partículas virales, se filtraron por 0,45 µm y se almacenaron a -80 °C. Posteriormente se usaron alícuotas de estos sobrenadantes para calcular el título viral (nº unidades de transducción por mL sobrenadante), transduciendo la línea celular HT1080 con diluciones seriadas del sobrenadante y calculando por citometría de flujo el porcentaje de células EGFP⁺. Por último, se calculó el título viral con la fórmula:

$$\text{Título (unidades de transducción / mL)} = \frac{\text{nº de células transducidas} \times \text{células EGFP} \times \text{dilución}}{\text{volumen (mL)}}$$

Para los experimentos de transducción de progenitores de médula ósea de ratón con los vectores retrovirales el transgén se dispuso de la línea empaquetadora Nxe (Phoenix ECO). Esta línea constituye un sistema de producción de retrovirus de segunda generación basado en la línea HEK293T, que expresa de forma estable las proteínas gag-pol y la envuelta ecotrópica con tropismo específico hacia células de ratón (Swift et al., 2001). La principal característica de esta línea es la alta eficacia de transfección usando tanto fosfato cálcico como métodos de transfección basados en complejos con lípidos. Estas transfecciones se hicieron usando FuGene 6 Transfection Reagent (Roche) siguiendo las instrucciones anteriormente descritas y usando 20 µg del vector de transferencia (pLZR-IRES-EGFP/pLZR-BJ-IRES-EGFP). A las 24 y 48h los sobrenadantes retrovirales se recogieron y filtraron por un filtro de nylon de 0,45 µm y se almacenaron a -80 °C. En este caso los sobrenadantes retrovirales se titularon utilizando la línea celular NIH3T3.

7.- Transducción retroviral de líneas celulares y células primarias de ratón

Con objeto de generar un modelo celular que expresase de forma estable el transgén BCR-JAK2, la línea celular Ba/F3 se transdujo con sobrenadantes retrovirales RV:control y RV:BJ. Se realizaron pre-cargas en placas recubiertas con 12,5 mg/mL Retronectina® (Takara Bio Inc., Japón) durante 4 ciclos de 30 minutos y después 2 ciclos de transducción durante la noche en dos días consecutivos a 37 °C y 5% CO₂. La Retronectina® es una proteína recombinante basada en un

fragmento de la fibronectina humana que aumenta la eficacia de transducción ya que posee un dominio de unión a células y otro de unión a virus, favoreciendo la colocación de ambas (Hanenberg et al., 1996). El volumen de sobrenadante usado se calculó en base a una multiplicidad de infección (*multiplicity of infection*, MOI) de 50 virus/célula. Después de cada ciclo de transducción se substituyó el medio infectivo por medio fresco. Siete días después se seleccionaron las células EGFP⁺ por medio de un separador celular FACSaria (Becton-Dickinson, USA).

Para los experimentos de trasplante, los progenitores de médula ósea de ratón Balb/c (Lin⁻) previamente pre-estimulados durante 48h se transdujeron con sobrenadantes retrovirales (RV: control y RV:BJ) pre-cargados en placas recubiertas de Retronectina® 12,5 mg/mL. Se cargó 1mL de sobrenadante viral durante 30' a 37 °CC y 2500 rpm, repitiendo este ciclo 4 veces. Posteriormente se cargó 0,5 mL de sobrenadante fresco y se añadieron las células en placas p6 a una densidad de 500.000 células/mL en un volumen total de 1 mL.

Una vez finalizados los ciclos de transducción las células se lavaron dos veces en PBS y se resuspendieron en medio IMDM sin suero a una densidad de $2,5 \times 10^6$ células/mL para ser trasplantadas en las hembras receptoras.

8.- Trasplante de progenitores de médula ósea en hembras receptoras letalmente irradiadas

El día del trasplante se recogieron las células, se lavaron dos veces en PBS, se contaron y se resuspendieron en PBS (500000 células por animal) para ser inyectadas por la vena caudal a hembras singénicas receptoras que habían sido previamente irradiadas a letalidad (4,25 Gy-24h-4,25 Gy) con un equipo de rayos X a 300 kV y 1,5 Gy/min. Las hembras receptoras del trasplante se mantuvieron en jaulas aisladas con agua acidificada y pienso autoclavado en el Animalario del CIEMAT. Cada 30 días se realizaron análisis de sangre con un contador hematológico Abacus Junior Vet (CMV, España) y por citometría de flujo. Además, se realizaron punciones medulares con objeto de monitorizar el estado del trasplante y detectar signos de enfermedad a nivel de médula ósea.

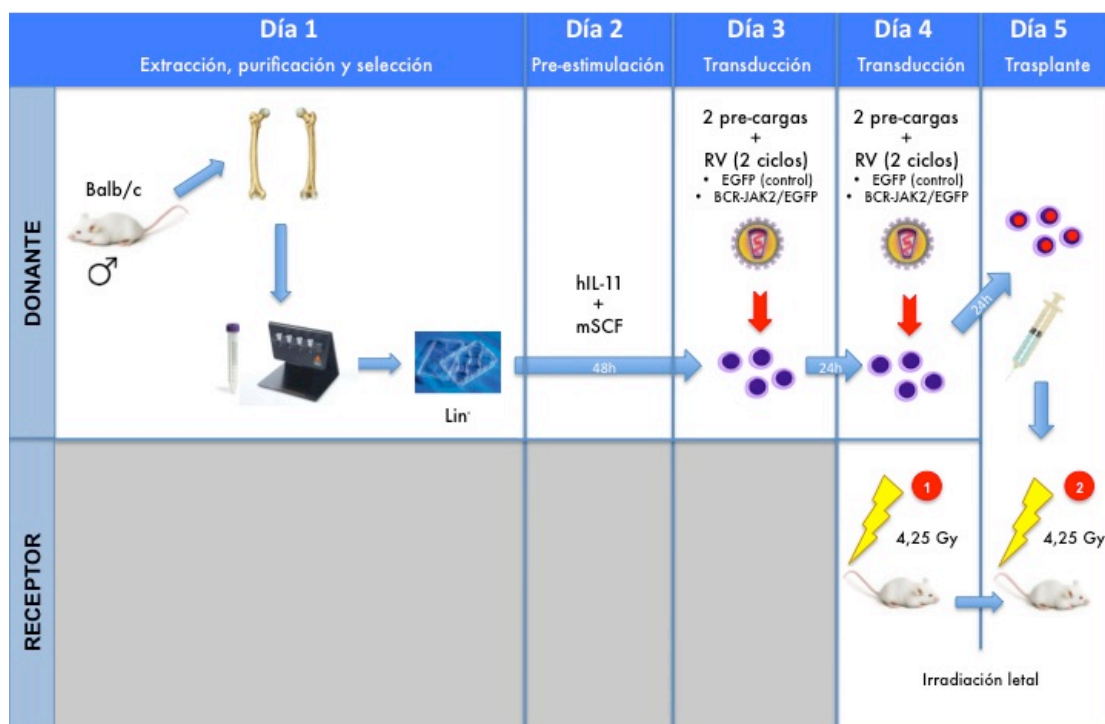


Figura 8: Esquema general de la purificación, transducción y trasplante de células de médula ósea de ratón transducidas con un vector retroviral.

9.- Cultivos clonogénicos

Para evaluar y cuantificar la capacidad de las células Lin⁻ trasplantadas en ratón para generar progenitores hematopoyéticos se hicieron en paralelo cultivos clonogénicos en metilcelulosa con citoquinas recombinantes de ratón MethoCult® GF M3534 (Stem Cell Technologies). Se sembraron 500 y 1000 células/mL en placas p60 y se cultivaron a 37 °C, 5% CO₂ y 90% de humedad. Siete días después se contaron el número total de unidades formadoras de colonias (UFC) tanto granulo-macrofágicas (UFC-GM) como eritroides (UFC-E) y mixtas (UFC-M). También se contaron las colonias EGFP⁺ usando un microscopio de fluorescencia Leica DLS (Leica Microsystems, Alemania) con objeto de determinar el porcentaje de células transducidas y evaluar la capacidad de proliferación de los progenitores.

10.- Ensayos de tumorigénesis

Para los ensayos de tumorigénesis se utilizaron 10 hembras BALB/c OlaHsd-Foxn1^{nu/nu}. A cada ejemplar se le inyectaron subcutáneamente 10⁷ células Ba/F3 en los flancos traseros, bien expresando BCR-JAK2/EGFP (flanco derecho) o sólo con el vector control expresando EGFP

(flanco izquierdo). Los tumores se hicieron macroscópicamente visibles a los pocos días y se examinaron por palpación hasta que finalmente a los 20 días post trasplante se sacrificaron los ratones, se extrajeron los tumores, se disgregaron en IMDM con 20 µg/mL de colagenasa (Sigma-Aldrich) durante 4h. y se analizaron para detectar la señal de fluorescencia EGFP usando una fotoestación 2000-MM Image Station (Kodak, USA). Otra parte de las células se usó para extraer ARNm y analizar por RT-PCR y el resto para analizar por citometría de flujo y determinar el porcentaje de células EGFP⁺ dentro del tumor.

11.- Inmunofluorescencia

Las células HEK293T transfectadas transitoriamente se fijaron en una solución de PBS con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente y se permeabilizaron con solución de PBS NP-40 0,1%. Después se incubaron los portas con una solución de bloqueo TNB para evitar uniones inespecíficas (0,1M Tris-HCl, 0,15M NaCl y 0,5% agente bloqueante Boehringer Mannheim) durante 45 minutos a 37 °C y se incubaron con un anticuerpo anti-JAK2 (C-20 Ab, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) durante 2h a 37 °C. Después de un ciclo de lavado en PBS, las células se incubaron con un anticuerpo secundario anti-ratón Rhodamine Red-X H+L (Molecular Probes) durante 25 minutos a 37 °C. Los núcleos se tiñeron con DAPI (4',6-diamidino-2'-fenilindol diclorhidrato, Pierce). Los portas se montaron con medio DakoCytomation Mounting Medium (Dako) y se analizaron y fotografiaron en un microscopio confocal Leica TCS-Sp (Leica Microsystems).

13.- Análisis histopatológico de tejidos de ratón

Los bazo de ratones trasplantados con células Lin⁻ EGFP⁺ o Lin⁻ EGFP⁺/BCR-JAK2⁺ se extrajeron en el momento del sacrificio del animal y se incluyeron en Tissue-Tek (DAKO) para su posterior análisis de expresión por inmunofluorescencia. Se hicieron cortes en criostato de 10 µm de grosor y se congelaron a -20 °C. Los cortes se fijaron en PBS 4% PFA (paraformaldehído) y se bloquearon y permeabilizaron en una solución de PBS 1% BSA, 10% suero fetal bovino, 0,3M glicina y 0,1% Tween-20 durante 1 hora a temperatura ambiente. La tinción con el anticuerpo primario anti-JAK2 (Cell Signaling) se hizo en cámara húmeda y oscura a 4 °C durante toda la noche. Posteriormente se hicieron tres lavados con PBS y se incubaron los cortes con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con el fluorocromo Alexa495 (Life Technologies) y 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1:1000) durante 45min. Las muestras se lavaron tres veces con PBS y se montaron con medio de montaje Mowiol. Finalmente, las muestras se analizaron y fotografiaron con un equipo Leica DLS (Leica Microsystems).

Para evaluar la presencia de lesiones histológicas en los tejidos hematopoyéticos, las extensiones de sangre periférica y médula ósea y cortes de bazo fresco se tiñeron con soluciones de hematoxilina/eosina (Merck), sumergiendo los portaobjetos en las siguientes soluciones durante los tiempos indicados: alcohol 100% durante 1', alcohol 96% durante 1', alcohol 80% durante 1', H₂O destilada, hematoxilina durante 2', H₂O durante 1', eosina durante 15", introducir en H₂O y sacar inmediatamente, alcohol 70% durante 1', alcohol 96% durante 1', alcohol 100% durante 1', xilol durante 1'. Por último, se montaron las muestras con medio de montaje Mowiol y se cubrieron con cubreobjetos.

14.- Hibridación fluorescente *in situ* (FISH) sobre células de médula ósea del paciente

La hibridación fluorescente *in situ* se realizó sobre muestras de núcleos interfásicos de médula ósea del paciente y usando un juego de sondas verdes para BCR (LSI® 22 BCR Spectrum Green™; Vysis) y sondas rojas de cromosomas artificiales de bacterias (BAC) que cubrían el gen JAK2 completo. Los núcleos se tiñeron de azul con DAPI. Las posiciones de los clones sobre el gen JAK2 se basaron en los datos ofrecidos por el Genome Browser (version hg18, marzo 2006) de la University of California – Santa Cruz. Los clones de BAC se obtuvieron del BACPAC Resource Center at the Children's Hospital (Oakland, USA) y del Sanger Institute Mapping Core Group en The Wellcome Trust Sanger Institute (Hinxton, Reino Unido) (<http://cancerres.aacrjournals.org>). El DNA de los BACs se aisló de cultivos de 5mL usando el procedimiento estándar para Miniprep (PhasePrep™ BAC DNA Kit, Sigma-Aldrich) y se marcó con SpectrumGreen-dUTP and SpectrumOrange-dUTP (Vysis).

La hibridación fluorescente se realizó de acuerdo al procedimiento estándar: para ello se lavaron las preparaciones de médula ósea con solución SSC 2X durante 2' a 37 °C y se deshidrataron en una serie de etanol (70%, 85%, 100%) durante 2' en cada punto de la serie y se dejaron secar al aire. Después se prepararon las sondas y se diluyeron en tampón comercial con agua destilada. Se dispusieron las sondas encima de los portaobjetos y se cubrieron con un cubreobjetos de cristal. Las muestras se desnaturalizaron a 75 °C durante 2' y se dejaron incubando durante 18-20h a 37 °C en cámara húmeda. Al día siguiente, se retiraron los cubres y se lavaron con solución SSC 2X 0,05% Tween-20 durante 30". Por último se añadieron 12 µL de DAPI y se cubrieron los portaobjetos con cubreobjetos de cristal. Los resultados se analizaron por microscopía de fluorescencia con un equipo AXIO (Zeiss). En todos los experimentos se contaron de 100 a 150 núcleos interfásicos.

15.- Análisis de subpoblaciones hematopoyéticas por citometría de flujo

El control rutinario del estado de los ratones trasplantados se hizo por marcajes de linaje en sangre periférica y médula ósea con los siguientes anticuerpos, todos conjugados con ficoeritrina (PE): anti-Gr-1 (RB6-8C5), anti-Mac-1 (M1/70), anti-B220 (RA3-6B2), anti-CD3- ξ (145-2C11) y anti-Ter119 (TER119), todos ellos de BD Pharmingen. Para el marcaje se usaron 1×10^6 células de sangre periférica o de médula ósea, se añadió 1 μ L de anticuerpo y se dejó incubando 30' a 4 °C y en oscuridad. Después se lisaron los eritrocitos con tampón de lisis (0,1M KHCO₃, 1,55M NH₄Cl, 1mM EDTA). Para ello se añadió a los tubos marcados 2,5 mL de solución de lisis de eritrocitos, se resuspendieron las células en un agitador y se dejaron incubando 15' a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido ese tiempo se lavaron los tubos con 1 mL de PBA (PBS, 1% BSA, 0,01% azida sódica) y se centrifugaron a 1400 rpm durante 7' a 4 °C. Se descartaron los sobrenadantes, se resuspendieron los pellets en 300 μ L de PBA y se añadió ioduro de propidio para teñir células no viables. Las muestras se analizaron en un citómetro EPICS XL (Beckman Coulter). Para interpretar los datos del citómetro se usó el software CXP.

Los marcajes específicos para progenitores hematopoyéticos comprometidos a linaje se llevaron a cabo con los siguientes anticuerpos: anti Lin⁻ conjugados con PE (anti-Gr-1, anti-Mac-1, anti-B220, anti-CD3, anti-Ter119; Pharmingen), anti-Sca-1 conjugado con APC-Cy7 (D7, Biolegend), anti-c-Kit conjugado con PE-Cy7 (2B8, Biolegend), anti-CD16/32 conjugado con PercP-eFluor710 (93, eBioscience) y anti-CD34 conjugado con Alexa647 (RAM34, BD Pharmingen).

Para esta tinción se usaron 1×10^6 células que se marcaron con el procedimiento anteriormente descrito. En el último paso las células se resuspendieron en 400 μ L de PBA y se añadió 0,5 μ L de DAPI 2 μ g/mL. Las muestras se analizaron en un citómetro LSRFortessa (Becton-Dickinson) y los datos se analizaron con el software FlowJo versión X para Mac OS X.

16.- Estudios de apoptosis

Los niveles de apoptosis de las células Ba/F3 (con y sin tratamiento TG101209) se midieron en base a los marcajes con anexina-V y 7-amino-actinomicina D (7-AAD). Para diferenciar la apoptosis temprana de la tardía se añadió 7-AAD, ya que es excluido por la membrana plasmática de las células viables. Las anexinas son una familia de moléculas que se unen preferentemente a fosfatidil-serina, que en condiciones fisiológicas se localiza en la cara interna de la membrana plasmática. Sin embargo, la membrana pierde esta distribución asimétrica cuando entra en apoptosis, de modo que éstas células pueden marcarse con este compuesto. Para ello, se lavaron las células dos veces con PBS frío a 1400 rpm durante 7' y a 4 °C y se resuspendieron en solución

de marcaje 1X (BD Biosciences) a una concentración de 1×10^6 cells/ml. Después se hicieron alícuotas de 100 μ L, se añadieron 5 μ L de anexina-V marcada con ficoeritrina (PE) y 5 μ L de 7-AAD. Se mezclaron y dejaron incubando durante 15' a temperatura ambiente en oscuridad. Por último se añadieron 400 μ L de solución de marcaje 1X y se analizaron las muestras finalmente con un citómetro EPICS XL (Beckman Coulter) para determinar los porcentajes de células en apoptosis tanto temprana como tardía. Para analizar los datos del citómetro se usó el software FlowJo versión X para Mac OS X.

17.- Diagnóstico molecular y análisis de la expresión génica por RT-PCR y qPCR

17.1.- PCR para diagnóstico molecular del paciente con LAL

La extracción de ARN se realizó usando Ultraspec® (Biotecx). Se resuspendieron las muestras en 1 mL de reactivo Ultraspec y se congelaron durante la noche a -80 °C. Al día siguiente se descongelaron, se añadieron 200 μ L de cloroformo y se dejaron 4-5' en hielo. Después se homogeneizaron en agitador, se dejaron 15' en hielo y se centrifugaron a 12000 rpm durante 15' a 4 °C. Se recogieron los sobrenadantes, se añadió 1 volumen de isopropanol (2-propanol) y se dejaron incubando 10-15' en hielo. Se centrifugaron las muestras a 12000 rpm durante 10' a 4 °C y se lavaron 2 veces con 1 mL etanol 75%. Por último se centrifugaron a 7500 rpm durante 5' a 4 °C y se descartó el sobrenadante. El ARN precipitado se resuspendió en H₂O destilada y se cuantificó la concentración de ARN con ayuda de un espectrofotómetro NanoDrop. Estas alícuotas se almacenaron a -80 °C.

Posteriormente, se realizó la transcripción reversa usando el kit RetroScript® (Ambion). Para ello se usaron 1-2 μ g de ARN como molde y se programó el termociclador como sigue: 5' a 95 °C, 60' a 50 °C, 10' a 92 °C y ∞ a 4 °C.

La PCR para el transcrito BCR-ABL^{p190} se llevó a cabo usando como control los niveles de ARNm del gen endógeno ABL sobre muestras de médula ósea (van Rhee et al., 1995) utilizando el kit AmpliTaq polymerase with Gene Amp® (Applied Biosystems). Se usaron los primers BCR-B y ABL3 (5' CAGTCTGGAGAAACACTCCTGGTACC 3') (ver Tabla 6) y se programó el termociclador como sigue: 15' a 42 °C, 5' a 94 °C, (1' a 96 °C, 25" a 69 °C, 1' a 72°C) x 30 ciclos, 10' a 72 °C, ∞ a 4 °C.

17.2.- Amplificación y clonaje del ADNc de BCR-JAK2

Para amplificar la secuencia completa de BCR-JAK2 se usó el kit GC-RICH PCR System® (Roche) y los primers BCR-Fw-T y JAK2-Rv-T, con el siguiente programa para el termociclador: 3' a 97°C, (30'' a 97 °C, 30'' a 57 °C, 2' a 72 °C) x 40 ciclos, 10' a 72°C, ∞ a 4°C.

El producto de la PCR con el ADNc de BCR-JAK2 completo fue clonado en el vector PCR2.1-TOPO® (Invitrogen) y secuenciado con un equipo ABI PRISM 337 DNA sequencer (Applied Biosystems). Las secuencias resultantes se alinearon por medio del software BLAST y ClustalW.

17.3.- Análisis de la expresión génica por RT-qPCR

El método para extraer ADN procedente de células de médula ósea, sangre periférica y bazo ha sido el DNeasy kit (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La expresión del gen de fusión BCR-JAK2 se cuantificó por medio de sondas TaqMan® diseñadas para hibridar en la región próxima al punto de rotura BCR-JAK2 con los primers BJ-Fw y BJ-Rv. El programa para el termociclador RotorGene RG-3000 (Corbett Research) fue el siguiente: 10' a 95 °C, (30'' a 95 °C, 30'' a 62 °C, 30'' a 72 °C) x 55 ciclos, ∞ a 4 °C. Los datos de expresión de BCR-JAK2 se normalizaron usando los niveles de expresión de *Gapdh* de ratón en las mismas muestras (ver Tabla 2).

Para determinar la expresión de BCR-JAK2 en los tumores de ratones inmunodeficientes se realizó una RT sobre ARN extraído con Ultraspec® (Biotecx) y luego una PCR con los oligonucleótidos BCR-B y JAK2-3 y el siguiente programa para el termociclador: 10' a 95 °C, (1' a 95 °C, 1' a 69 °C, 1' a 72 °C) x 35 ciclos, 7' a 72 °C y ∞ a 4 °C. Los productos de la PCR se separaron en un gel de agarosa 0,8% con bromuro de etidio y se visualizaron en una fotoestación Gel Doc XR+ (BioRad) para detectar la presencia o ausencia del amplicón, de un tamaño de 997 bp.

Las qPCRs para los genes diana de Stat5 Bcl-xL y Osm se realizaron usando el kit LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics). Para el gen *Socs2* se usó el kit RT2 qPCR Primer Assay® (SABiosciences), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los datos se normalizaron con la expresión de los genes *H3* (muestras del paciente) o *Gapdh* (línea celular Ba/F3).

Como procedimiento de cálculo del cambio en los niveles de ARNm se ha usado el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde Ct (*cycle threshold*, ciclo umbral) representa el número de ciclos necesarios para obtener una señal que sobrepase el nivel de fluorescencia de fondo (Livak and Schmittgen, 2001).

17.4.- Cálculo del número de copias integradas del vector (VCN)

Para calcular el número de copias integradas del vector en muestras de tejido hematopoyético de los animales trasplantados se realizó una qPCR con sondas y oligos específicos para amplificar la secuencia del gen EGFP, usando como control endógeno la titina (ver Tabla). Además, se empleó una curva seriada de un plásmido que contiene el gen de la EGFP y el de la titina, con objeto de extrapolar los datos obtenidos (Charrier et al., 2011).

El programa para el termociclador fue el siguiente: 10' a 95 °C, (30" a 95 °C, 30" a 58°C, 20" a 72°C) x 50 ciclos, ∞ a 4 °C.

PCR	Gen	Nombre oligo	Secuencia 5'-3'	Tª anillamiento (°C)	Ciclos	Tamaño amplicón (bp)	Posición (nt)
Cualitativa	<i>BCR-JAK2</i>	BCR-Fw-T	GCCATGGTGGACCCGGTGG	55	35	2260	594-612 ¹
		JAK2-Rv-T	AAGGTCATTTCTTTCATCCAGCC				3884-3906 ²
Cuantitativa	<i>BCR-JAK2</i>	Sonda BJ	CAGATCTGGCCCAACGATGGCG-Fam	62	55	109	1234-1256
		BJ-Fw	TGGGCGTCCGCAAGAC				1214-1230
		BJ-Rv	CTCATATTTGGTAACATGTCATTTTCTG				1295-1323
	<i>BCR-JAK2</i>	Sonda FRET-FL	GTCTTGCGGACGCCACGA-FL *	63	45	997	1211-1229
		Sonda FRET-LC640	LC640-GGTGGCCTCGGACACGACAACC+				1188-1209
		BCR-B-Fw	CCCCCGGAGTTTGTAGGATTG				1547-1567
		JAK2-3-Rv	GGCCACAGAAAACCTTGCTCTC				1828-1847
	<i>BCR</i>	BCR-B-Fw	CCCCCGGAGTTTGTAGGATTG	63	45	301	1547-1567 ¹
		BCR-B-Rv	ATCGTTGGGCCAGATCTGCC				1828-1847 ¹
	<i>Bcl-xL</i>	Bcl-xL Fw	TCAGAGCTTTGAGCAGGTAGTG	58	45	187	726-747 ³ 552-573 ⁴

	Bcl-xL Rv	TCCCGTAGAGATCCACAAAAG				935-955 ³ 761-781 ⁴
<i>Osm</i>	Osm Fw	AGAATCAGGCGAACCTCACGG	58	45	74	217-237 ⁵
	Osm Rv	GTGTGTTTCTAGGTTTGGAGGC				271-291 ⁵
<i>Gapdh</i>	Gapdh Fw	AGAAGGTGGTGAAGCAGGCATC	58	45	116	820-841 ⁶
	Gapdh Rv	CGGCATCGAAGGTGAAGAGTG				915-936 ⁶
<i>H3</i>	H3 Fw	AAAGCCGCTCGCAAGAGTGCG	62	35	201	185-205 ⁷
	H3 Rv	ACTTGCCTCCTGCAAAGCAC				387-406 ⁷
	Sonda EGFP	CTTGCCGTAGGTGGC-Fam				111-126 ⁸
EGFP	EGFP-Fw	GTAAACGCCCAAGTTCAGC	58	50	85	66-87 ⁸
	EGFP-Rv	TGGTGCAGATGAACTTCAGGG				130-151 ⁸
	Sonda Titina	TGCACGGAAGCGTCTCGTCTCAGTC-TxRed				99838-99858 ⁹
Titina	Tit-Fw	AAAACGAGCAGTGACGTGAGC	58	50	123	99941-99961 ⁹
	Tit-Rv	TTCAGTCATGCTGCTAGCGC				99860-99879 ⁹

Tabla 2: Secuencias de oligonucleótidos cebadores y sondas usados para RT-PCR y qPCR. Se muestran las condiciones de las PCR tanto cualitativas como cuantitativas (temperatura de anillamiento, número de ciclos, tamaño y posición del amplicón). Fw, directo; Rv, inverso; FL, fluoresceína; LC640, LightCycler Red. *,+: secuencia inversa y complementaria de la sonda para BCR humano; ¹ BCR humano (NM_004327); ² JAK2 humano (NM_004972); ³ BCL-XL humano (BCLXL ó BCL2L1) (NM_1385781); ⁴ Bcl-xL ratón (BCL2-like 1 ó Bcl2l1) (NM_009743) y ⁵ Osm ratón (oncostatina M) (NM_001013365.2); ⁶ Gapdh ratón (gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa) (NM_008084.2), ⁷ H3 humano (H3F3A) (NM_002107.3), ⁸ EGFP (pLZR-IRES-EGFP), ⁹ titina ratón (NC_000068.7). Los oligonucleótidos para Bcl-xL y H3F3A se diseñaron para hibridar tanto con secuencias humanas como de ratón (muestras de paciente y muestras de la línea celular Ba/F3, respectivamente).

18.- Western Blot y anticuerpos

Las células se centrifugaron 10' a 1200 rpm y 4 °C y se resuspendieron en 300 µL de tampón de lisis 0,1M Tris pH 8, 0,3M NaCl, 2% NP-40, mezcla de inhibidores de proteasas Mini 1X EDTA-free y mezcla de inhibidores de fosfatasa 1X PhosSTOP (Roche).

Para los lisados inmunoprecipitados con anti-fosfotirosina (anti-p-Tyr, BD) se calculó el volumen necesario para tener 500 µg de proteína por medio del método con reactivo Bradford. Éste método consiste en elaborar una recta patrón con concentraciones conocidas de BSA y extrapolar las absorbancias a 595nm obtenidas para los lisados proteicos y así determinar la concentración de proteína en cada muestra. Posteriormente los lisados se incubaron durante 1h en rotación a 4°C con un volumen de 20 µL de esferas con proteína A/G (Invitrogen), con objeto de evitar arrastrar proteínas que se unen inespecíficamente a las esferas, en un proceso de preclareado del lisado total. Después se centrifugaron los tubos a 2500 rpm durante 5' a 4 °C y se recogieron los sobrenadantes. Estos lisados preclareados se incubaron con un volumen de 20 µL de esferas con proteína A/G y 1 µg de anticuerpo anti-p-Tyr durante una noche en rotación a 4 °C. Al día siguiente se lavaron con tampón de lisis 3 veces en la centrífuga a 2500 rpm durante 5' a 4 °C y se resuspendieron en 20 µL de tampón de carga de electroforesis.

Tanto los lisados de proteína total (50 µg) como los lisados inmunoprecipitados con anticuerpo pTyr (500 µg) se resolvieron por electroforesis en condiciones reductoras (β-mercaptoetanol) usando geles prefabricados de gradiente 4-12% Bis-Tris (Invitrogen). Después se transfirieron a membranas de metilcelulosa (GE Healthcare) y se hibridaron con los siguientes anticuerpos: anti-JAK2, anti-p-STAT5 (Cell Signaling), anti-STAT5, anti-IkBα (Santa Cruz Biotechnology), anti-Bcl-xL (BD Biosciences), anti-tubulina (Sigma-Aldrich) y anti-TBP (Abcam). Después se usaron anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa (HRP) anti-ratón/anti-conejo (GE Healthcare).

Los extractos enriquecidos en fracción nuclear y citoplásmica se obtuvieron por medio del kit NE-PER® (Thermo Scientific) después de un choque hipotónico en cloruro sódico 10 mM durante 10 minutos.

Las membranas se revelaron usando el reactivo SuperSignal West Pico Chemiluminescent Reagent® (Thermo Scientific) y una máquina reveladora Imaging Station (Kodak). Para cuantificar las membranas densitométricamente se usó el software Image-Gauge v3.46 (FujiFilm).

19.- Estudios epigenéticos: análisis del estado de metilación de la región promotora del vector retroviral

Con objeto de determinar el estado de metilación de la región U3 de la LTR retroviral que dirige la expresión estable del transgén en las células trasplantadas, se realizó un estudio basado en la conversión de citosinas no metiladas a uracilo en presencia de bisulfito sódico. Este procedimiento deja las citosinas metiladas inalteradas de modo que después de secuenciar las muestras se puede saber cuántas se encontraban modificadas y así determinar el grado de metilación del promotor.

	SECUENCIA ORIGINAL	DESPUÉS DE BISULFITO SÓDICO
DNA NO METILADO	N-C-G-N-C-G-N-C-G	N-U-G-N-U-G-N-U-G
DNA METILADO	N-C-G-N-C-G-N-C-G	N-C-G-N-C-G-N-C-G

Tabla 3: Conversión de citosina en uracilo en DNA no metilado en presencia de bisulfito sódico

Para ello se incubó 1 µg de ADN procedente de un grupo (*pool*) de unidades formadoras de colonia (UFC) de médula ósea de los ratones trasplantados con una solución de bisulfito sódico usando el kit EpiTect Bisulfite® (QIAGEN) con las siguientes condiciones:

	Tiempo (minutos)	Temperatura (°CC)
Desnaturalización	5	95
Incubación	25	60
Desnaturalización	5	95
Incubación	85	60
Desnaturalización	5	95
Incubación	175	60
Mantenimiento	∞	20

Tabla 4: Condiciones del tratamiento de ADN con bisulfito sódico. Se muestran los tiempos y temperaturas de cada ciclo del tratamiento.

Posteriormente se lavó y purificó la solución en una columna para eliminar el bisulfito y se realizó una PCR anidada (Platinum Taq DNA Polymerase, Invitrogen) con un tampón potenciador (PCRx Enhancer system, Invitrogen) y oligonucleótidos específicos para amplificar la secuencia U3 de la LTR 5' retroviral. Estos oligonucleótidos fueron diseñados con ayuda del software MethPrimer y sus secuencias son:

- U3Fw (directo): 5' TTTTAAGGATTTGAAATGATTTTGTG 3'
- U3Rv (inverso): 5' TAATCAATCACTCAAAAAAACCCCT 3'

La PCR anidada se realizó programando el termociclador como sigue: 3' a 95 °C, (1' a 95 °C, 1' a 56 °C, 1' a 72 °C) x 35 ciclos, 10' a 72 °C, ∞ a 4 °C.

El producto de PCR se separó en un gel de agarosa al 2% y la banda correspondiente al fragmento amplificado (233 bp) se purificó (Gel Extraction Kit®, GE HealthCare) y clonó en el vector TOPO-TA® (TOPO-TA Cloning kit, Invitrogen) para ser posteriormente transformado en bacterias competentes TOP10. Estas bacterias se sembraron en agar con ampicilina y X-gal. Al día siguiente se seleccionaron las colonias blancas y se prepararon minicultivos de 5 mL de medio LB con ampicilina. El ADN se purificó usando el MINIPREP® Kit (Promega) y se secuenció con oligos M13 (directo y reverso). Para analizar las secuencias metiladas se usó el software MethPrimer v2.0.

20.- Análisis estadístico

Las curvas de dosis-respuesta se calcularon teniendo en cuenta el porcentaje de células vivas con respecto al control. Los valores de IC_{50} se obtuvieron algebraicamente resolviendo la ecuación de mínimos cuadrados resultante del ajuste anterior para un porcentaje de supervivencia del 50%.

Todos los datos cuantificables se expresan como la media aritmética \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes. La significación de las diferencias entre grupos fue determinada mediante el análisis de t-Student (prueba de Mann-Whitney de dos colas con un intervalo de confianza del 95%).

El procesamiento y análisis de los datos se realizó usando el programa informático GraphPad Prism 5 for Mac OS X.

RESULTADOS

1.- Resumen del caso clínico

El paciente a partir del cual se desarrolló este trabajo acudió Hospital y fue diagnosticado de una leucemia aguda linfoblástica (LAL) de tipo B en base a los siguientes análisis:

SEXO	EDAD	SINTOMAS	INMUNOFENOTIPO	CARIOTIPO
♂	58 años	Astenia, dolor abdominal y hepatoesplenomegalia	CD34 ⁺ , CD19 ⁺ , CD10 ⁺ , MPO ⁻ , CD79a ⁺ , HLA-DR ⁺ , tdt ⁺ , CD22 ⁺ , CD24 ⁺	COMPLEJO 49XY,+X,+2,+4,-9,-11,+19,add(19)(q13),+20,-22,+mar

Tabla 5: Cuadro resumen de los datos del paciente al diagnóstico a partir del cual se obtuvo el cDNA con el gen de fusión BCR-JAK2. Se muestran los síntomas, el resultado de la caracterización inmunofenotípica y el cariotipo.

2.- Identificación del gen de fusión BCR-JAK2 en un paciente con leucemia aguda linfoblástica (LAL)

Con el fin de saber si el paciente tenía el transcrito BCR-ABL se procedió a realizar una RT-PCR convencional usando RNA de médula ósea (MO) y sangre periférica (SP).

El resultado de la PCR para el punto de rotura *major* (M) fue negativo (ver esquema en Figura 6), pero sin embargo la reacción del punto de rotura *minor* (m) descubrió un producto de PCR de tamaño menor que el control positivo (Figura 9).

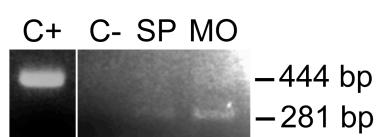


Figura 9: Identificación de la translocación BCR-JAK2 en el paciente al diagnóstico. Análisis por RT-PCR anidada con oligos estándar para p190 BCR-ABL (BCR-B y ABL3) en las muestras de sangre periférica (SP) y médula ósea (MO) al diagnóstico del paciente LAL, mostrando una amplificación inusual de 281 pb. C+: control positivo; C-: control negativo.

El análisis de la secuencia de 281 pb reveló que mantenía el marco de lectura y correspondía a la región esperada del exón 1 de BCR (la que se encuentra normalmente en el transcrito BCR-ABL p190) unida a 90 pb correspondientes al exón 19 de JAK2 y flanqueados por el oligo reverso de

ABL (ABL3). La razón por la que esta primera amplificación con oligos BCR-B y ABL-3 para detectar BCR-ABL dio como resultado el amplicón de BCR-JAK2 fue el alto porcentaje de homología del oligonucleótido ABL-3 con una secuencia del exón 19 de JAK2: hasta 12 nucleótidos eran complementarios a esta secuencia, lo que permitió la hibridación con la secuencia errónea y consecuentemente la amplificación del nuevo transgén (Figura 10).

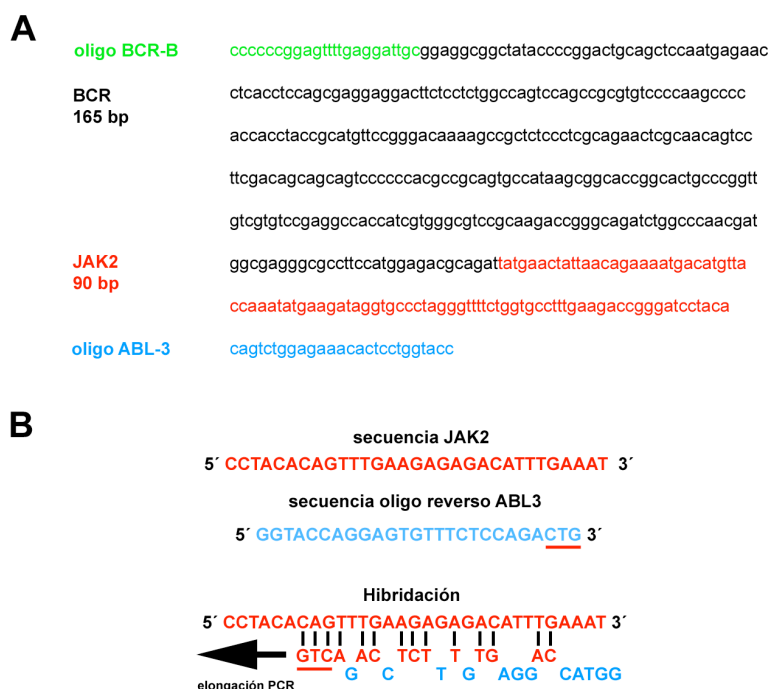


Figura 10: Secuencia del punto de rotura de BCR-JAK2. A) Secuencia del producto de PCR (281 bp) obtenido al diagnóstico usando los oligonucleótidos para detectar BCR-ABL p190. En verde, secuencia complementaria al oligonucleótido BCR-B; en negro, BCR (exón 1); en rojo, JAK2 (exón 19); en azul, secuencia complementaria del oligonucleótido ABL3 (figura 1). El marco de lectura abierto se mantiene. **B)** Análisis de alineamiento entre el oligonucleótido reverso ABL3 (azul) y la secuencia de JAK2 (rojo) obtenida en (A) que muestra 12 nucleótidos complementarios.

El resultado de la secuencia era semejante a los casos descritos de LMC y LMA para esta nueva translocación (Griesinger et al., 2005, Lane et al., 2008, Cirmena et al., 2008), y estos datos sugerían la presencia de un gen de fusión BCR-JAK2. Para confirmarlo se realizaron ensayos de RT-PCR con oligos para BCR (BCR-B) y el codón de parada de JAK2 (JAK2-Rv-T) sobre las mismas muestras al diagnóstico, obteniendo como resultado una banda específica de 1307 bp que, una vez secuenciada, contenía el dominio de oligomerización de BCR y el dominio tirosín-quinasa de JAK2 (Figura 11A). El ADNc completo de BCR-JAK2 se amplificó usando oligos flanqueantes al codón de comienzo de BCR (BCR-Fw-T) y el codón de parada de JAK2 (JAK2-Rv-T). El resultado fue un fragmento específico de 2260 bp (Figura 11B) que fue secuenciado y subclonado en el vector retroviral pLZR-IRES-EGFP para estudiar su función tanto *in vitro* como *in vivo*.

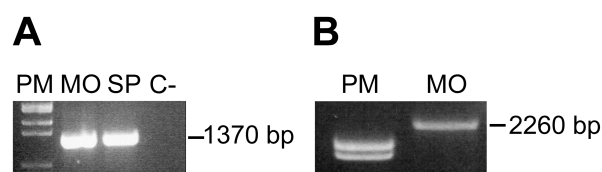


Figura 11: Amplificación del ADNc completo de BCR-JAK2 por PCR. A) Verificación del gen de fusión BCR-JAK2 por RT-PCR usando oligos para BCR (BCR-B) y la región flanqueante al codón de parada de JAK2 (JAK2-Rv-T). PM: marcador de peso molecular; C-: control negativo (BCR-ABL+ p210). **B)** Amplificación completa del ADNc de BCR-JAK2 por RT-PCR con oligos flanqueantes al codón de inicio de BCR y el codón de parada de JAK2. PM: marcador de peso molecular.

El cDNA completo, de 2260 pb, codifica para un polipéptido con una masa molecular de 83 kDa que contiene el dominio superhélice enrollada de BCR responsable de la oligomerización fusionado al dominio tirosín-quinasa de JAK2 (JH1) (Figura 12).

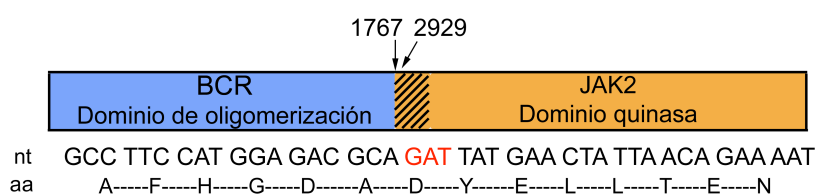


Figura 12: Representación esquemática de la estructura de la proteína quimérica BCR-JAK2: dominio de oligomerización de BCR y dominio kinasa de JAK2. Las secuencias de nucleótidos (nt) y aminoácidos (aa) muestran el punto de rotura (en rojo el triplete común a BCR y JAK2); los números indican la posición en pares de bases del punto de rotura para cada gen: 1767 en el gen BCR (NM_004327) y 2929 en el gen JAK2 (NM_4972).

3.- Detección de la fusión mediante hibridación *in situ* con sonda fluorescente (FISH)

Para confirmar la presencia inequívoca de un gen de fusión se realizaron ensayos adicionales de hibridación *in situ* con sondas fluorescentes. En primer lugar se usó un juego de sondas verdes (LSI 22 Spectrum Green) de 300 kb que cubre el extremo 5' del gen BCR, y el resultado fueron 3 señales en un 73% de los núcleos de la preparación, lo que sugería que un alelo de BCR estaba fragmentado (Figura 13A). A continuación, se usaron sondas específicas para los extremos 5' (rojo, 2302 3H3) y 3' (verde, 28A9 60G18) del gen JAK2, y el resultado fue de 3 señales en un 62% de los núcleos: una señal co-localizada rojo-verde (alelo normal), una roja, y otra verde (Figura 13B). Esto indicaba que existía un punto de rotura dentro del locus JAK2. Finalmente, se realizó la hibridación con la sonda verde para BCR (LSI 22 Spectrum Green) y una roja para JAK2 (927H16) y se observaron 3 señales verdes (BCR) y dos rojas (JAK2). Una de las señales verdes co-localizaba con una de las rojas, evidenciando de esta forma una fusión entre los genes BCR y JAK2 en un 41% de los núcleos observados (Figura 13C).

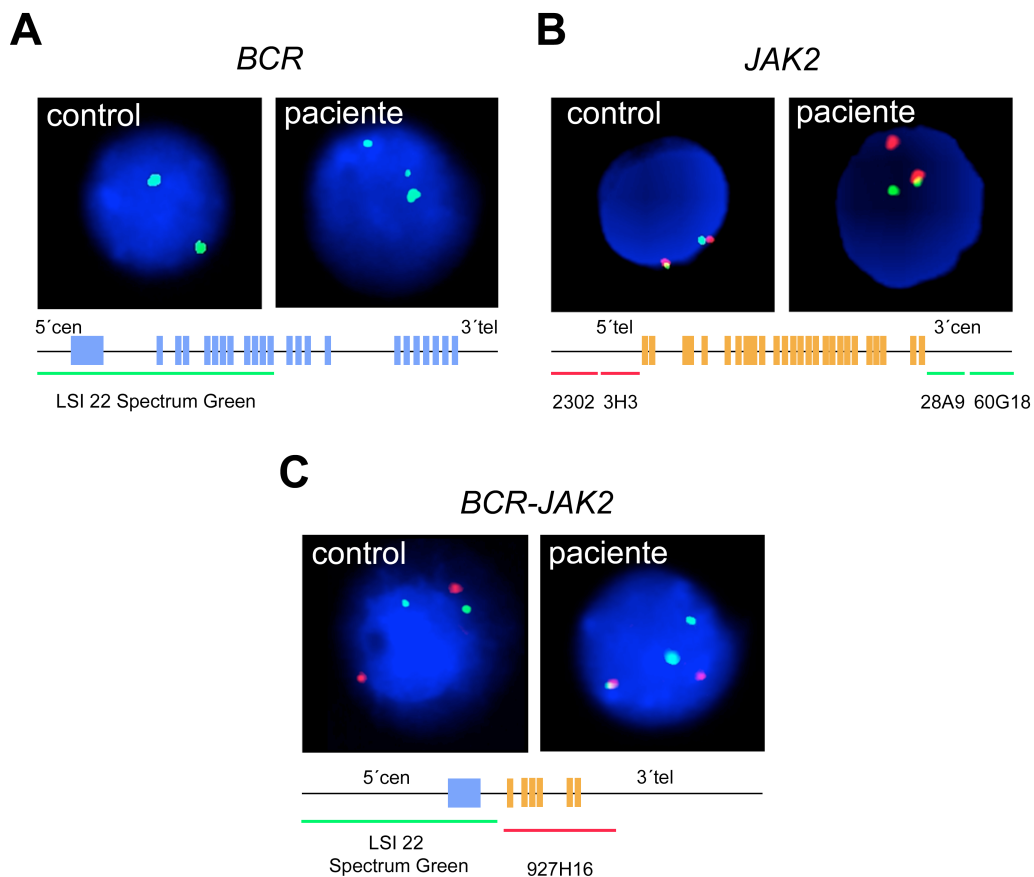


Figura 13: Análisis por hibridación in situ fluorescente (FISH) de núcleos interfásicos de células de médula ósea para confirmar la translocación BCR-JAK2. **A)** Las sondas LSI 22 Spectrum Green (verde) cubren la región 5' de BCR y muestran tres señales en el caso del paciente al diagnóstico, lo que indica una rotura del gen. **B)** Análisis FISH con sondas BAC flanqueantes del gen JAK2. La señal co-localizada roja y verde corresponde a la copia normal del gen (control). El alelo roto (reorganizado) en el caso del paciente al diagnóstico produce una señal roja y otra verde deslocalizadas. **C)** Análisis por FISH de la traslocación BCR-JAK2. En el caso del control sano se observan dos señales rojas y dos verdes. En los núcleos del paciente al diagnóstico se aprecian tres señales verdes: una de ellas co-localiza con una señal roja revelando una fusión génica BCR-JAK2.

4.- Seguimiento de la enfermedad mínima residual (EMR) del paciente por qPCR

Con objeto de poder monitorizar la evolución de la enfermedad mínima residual del paciente se diseñó un ensayo específico de qPCR para BCR-JAK2, usando sondas FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) (Figura 14). Gracias a esta nueva prueba se pudo confirmar que el paciente consiguió la remisión molecular completa (RMC) cinco semanas después de la terapia de inducción y justo antes del trasplante autólogo de médula ósea. La remisión molecular completa se mantiene hasta el momento actual.

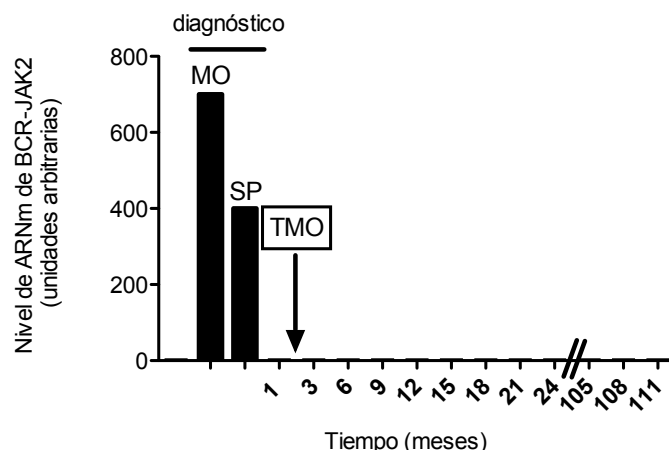


Figura 14: Detección de la enfermedad mínima residual del paciente por qPCR. Se diseñaron sondas FRET específicas para la fusión BCR-JAK2. Los niveles de transcrito BCR-JAK2 del paciente desde el diagnóstico hasta el presente se expresan en unidades arbitrarias y se normalizaron con respecto a los niveles endógenos de BCR (gen control). La respuesta molecular se obtuvo antes del trasplante de médula ósea. MO: médula ósea; SP: sangre periférica; TMO: trasplante de médula ósea.

5.- La expresión ectópica de BCR-JAK2 confiere independencia a factores de crecimiento

Para investigar la capacidad de transformación de BCR-JAK2 se usó como modelo la línea celular Ba/F3, que depende de la interleukina-3 (IL-3) para proliferar y que ha sido ampliamente utilizada como modelo para estudiar tanto la señalización intracelular disparada por las tirosinquinazas (Lacronique et al., 2000, Schwaller et al., 1998) como la capacidad de inhibición de esta actividad por parte de pequeños inhibidores específicos (Warmuth et al., 2007, Pardanani et al., 2007b). Las células se transdujeron con el vector retroviral control portador de la EGFP (pLZR-IRES-EGFP) y el vector retroviral BJ, que contiene el ADNc de BCR-JAK2 además de la EGFP (pLZR-BJ-IRES-EGFP).

Con objeto de cuantificar y confirmar la independencia de IL-3 en células que expresan BCR-JAK2 se realizaron ensayos de proliferación en presencia y ausencia de IL-3, usando como control positivo la línea Ba/F3 TEL-JAK2, cuya independencia de este factor de crecimiento ya fue descrita (Lacronique et al., 2000, Schwaller et al., 1998). Gracias a este ensayo se pudo comprobar que la línea Ba/F3 BCR-JAK2 era capaz de proliferar en cultivo *in vitro* tanto en presencia como en ausencia de IL-3, mientras que las Ba/F3 control seguían siendo dependientes de IL-3 (Figura 15). Además, es importante destacar que la tasa de crecimiento de las Ba/F3-BJ era significativamente mayor que la de la línea control.

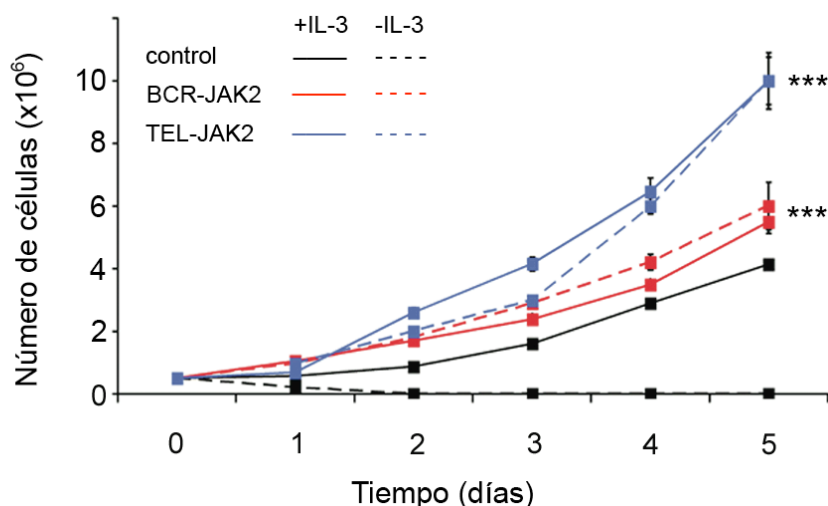


Figura 15: BCR-JAK2 confiere independencia de factores de crecimiento a la línea celular de ratón Ba/F3. Esta línea celular fue transducida con un vector retroviral control (Ba/F3-control, negro) y con un vector que porta la fusión génica BCR-JAK2 (Ba/F3-BJ, rojo). Como control positivo se usó la línea Ba/F3-TEL-JAK2 (azul). Se realizaron ensayos de proliferación en presencia (—) y ausencia (---) de IL-3 y se contaron diariamente durante 5 días con cámara Neubauer y azul tripan. Los resultados se expresan como media \pm desviación típica (n=3) y se presenta la significación para las líneas que crecen en ausencia de IL-3 (t de student, *** p<0,001).

Por otra parte, las microfotografías de las células en cultivo muestran que la línea Ba/F3 BCR-JAK2 crece típicamente formando grumos o racimos de células (Figura 16). Esto podría estar sugiriendo la existencia de cambios en moléculas de adhesión u otros componentes del citoesqueleto, tal y como se ha descrito para la fusión BCR-ABL (Bhatia et al., 1996).

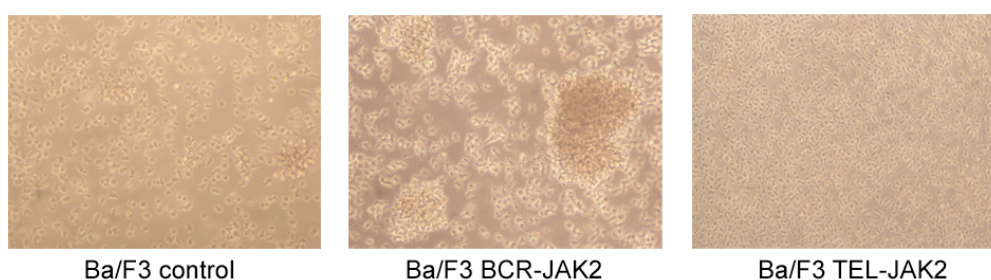


Figura 16: Microfotografías de la línea Ba/F3 control creciendo en presencia de IL-3 y las líneas Ba/F3 BCR-JAK2 y Ba/F3 TEL-JAK2 en ausencia de IL-3 (objetivo 20X).

Este conjunto de datos confirma la hipótesis de que BCR-JAK2 confiere una ventaja proliferativa a las células que lo expresan y que es capaz de transformarlas haciéndolas independientes de factores de crecimiento, como ya se ha descrito para otras proteínas de fusión como BCR-ABL (McLaughlin et al., 1987), TEL-JAK2 (Lacronique et al., 1997), BCR-FGFR1 (Demiroglu et al., 2001) y BCR-PDGFR (Baxter et al., 2002, Demiroglu et al., 2001, McLaughlin et al., 1987, Lacronique et al., 1997).

6.- BCR-JAK2 está constitutivamente fosforilada y dispara la activación de STAT5

A continuación procedimos a caracterizar la ruta intracelular implicada en la transformación de las células que expresan BCR-JAK2. Las proteínas de fusión implicadas en procesos neoplásicos tienen la capacidad de autofosforilarse en ausencia de señales externas y de esa forma pueden activar las cascadas de señalización pertinentes (Blume-Jensen and Hunter, 2001). Uno de los parámetros bioquímicos que indican transformación es la fosforilación constitutiva: la proteína quimérica no necesita ninguna señal activadora porque posee un dominio de dimerización adyacente al dominio tirosín-quinasa, de modo que éste está permanentemente fosforilado y por tanto activo. Para probar que BCR-JAK2 está constitutivamente fosforilado en ausencia de estímulos externos como la IL-3 se realizaron ensayos de Western Blot en los que se inmunoprecipitaron los lisados de proteína total con un anticuerpo anti-fosfo-tirosina y se revelaron las membranas con un anticuerpo anti-JAK2 para detectar la presencia de p-JAK2. En la Figura 17 se puede observar la fosforilación tanto de JAK2 endógeno (130 kDa) como de BCR-JAK2 (90 kDa) en las muestras inmunoprecipitadas, así como el control positivo TEL-JAK2, cuyo nivel de expresión es notablemente superior. Además, hibridando los lisados totales con anticuerpo anti-p-STAT5 se pudo comprobar que STAT5 se fosforila en presencia de IL-3 en la línea control, mientras que en el caso de las proteínas de fusión BCR-JAK2 y TEL-JAK2 dicha fosforilación ocurre incluso en ausencia de IL-3.

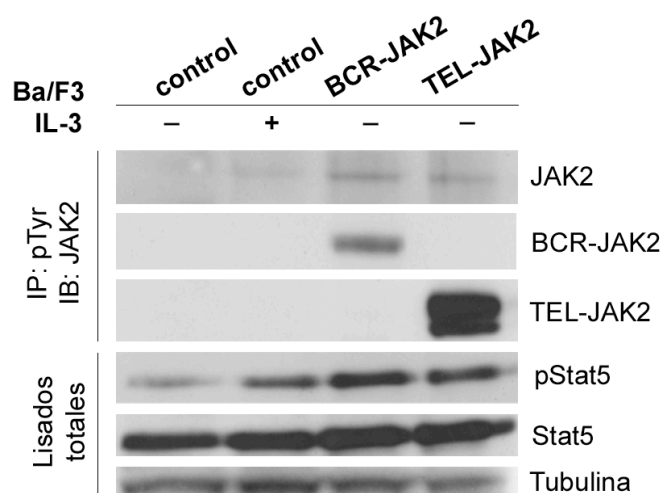


Figura 17: Análisis por Western Blot de lisados celulares de células Ba/F3 transducidas con BCR-JAK2, TEL-JAK2 o vector control (control). Los lisados celulares se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti-p-Tyr y se revelaron con anticuerpo anti-JAK2 para detectar p-JAK2 (panel superior, JAK2 endógeno: 130 kDa; BCR-JAK2: 90 kDa; TEL-JAK2: 72 kDa). Los lisados celulares totales se hibridaron con anticuerpos anti-p-Stat5 y anti-Stat5 (panel inferior). IP: inmunoprecipitación; IB: inmunorevelado.

Para demostrar que la activación de Stat5 era funcional era necesario comprobar su potencial de translocación al núcleo. De esta forma, se prepararon fracciones enriquecidas en núcleo y citoplasma a partir de lisados totales y se hibridaron con anticuerpos específicos anti-STAT5 y anti-pSTAT5. Como controles se usaron anticuerpos específicos para los compartimentos citoplasmático (proteína de unión a caja TATA, TBP) y nuclear (I κ B α). Se puede observar que pStat5 sólo se encuentra en el compartimento nuclear, lo que indica una activación funcional (Figura 18).

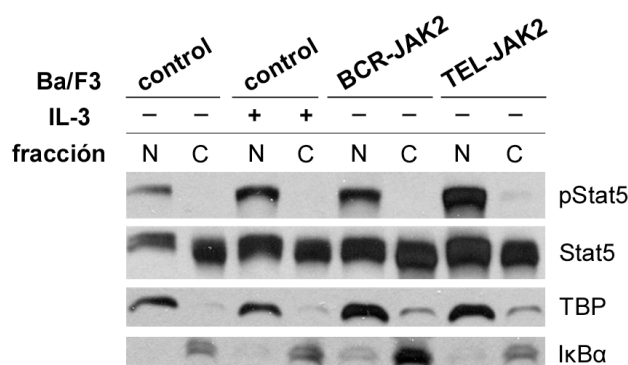


Figura 18: Análisis por Western Blot de extractos enriquecidos en núcleo (N) y citoplasma (C). Se analizaron las líneas Ba/F3 control, BCR-JAK2 y TEL-JAK2, hibridando lisados proteicos con anticuerpos anti-p-STAT5 y anti-STAT5. Como control de carga se usaron anticuerpos anti-TATA binding protein (N) y anti-I κ B α (C).

La localización subcelular de BCR-JAK2 se confirmó en experimentos de inmunofluorescencia en la línea celular HEK293T transfectada transitoriamente usando un anticuerpo anti-JAK2. Como se muestra en la Figura 19, el nivel de expresión de JAK2 endógeno es tan bajo que podemos distinguir la expresión de BCR-JAK2. Así, podemos apreciar una intensa señal de marcaje para JAK2 en el citoplasma de las células que expresan BCR-JAK2.

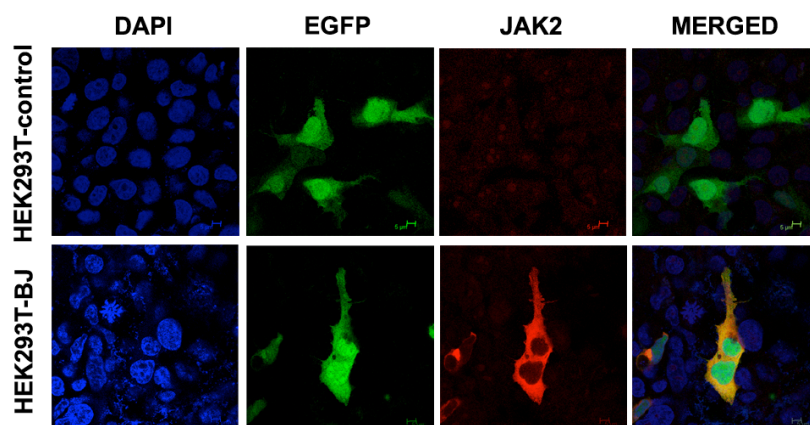


Figura 19: Análisis por inmunofluorescencia de células HEK293T transfectadas transitoriamente con vector control pLZR-control o pLZR-BCR-JAK2 y analizadas por microscopía confocal. En azul aparecen los núcleos marcados con DAPI, en verde aparece la señal EGFP (control de transfección), y en rojo la señal de expresión de JAK2, que aparece sólo en el citoplasma de las células transfectadas con BCR-JAK2.

7.- Inducción de genes diana de STAT5 en células que expresan BCR-JAK2

Con objeto de confirmar si la expresión de BCR-JAK2 y la consecuente fosforilación de STAT5 se traducían en una modulación de la actividad biológica, se procedió a analizar los cambios en el programa de expresión génica. Concretamente se comprobó la posible sobreexpresión de genes relacionados con la supervivencia y la proliferación: Bcl-xL, Osm y Socs2. En el caso de Bcl-xL se detectó un aumento en la expresión de 2 a 3 veces en la línea Ba/F3-BJ y en la Ba/F3-control + IL-3, datos que sugieren una regulación al alza de este gen anti-apoptótico mediada por BCR-JAK2 en ausencia de IL-3 (Figura 20). Esta sobreexpresión fue aún mayor en el caso de los otros dos genes estudiados (Osm y Socs2) en las células que expresan BCR-JAK2 así como en la línea celular usada como control positivo (control + IL-3).

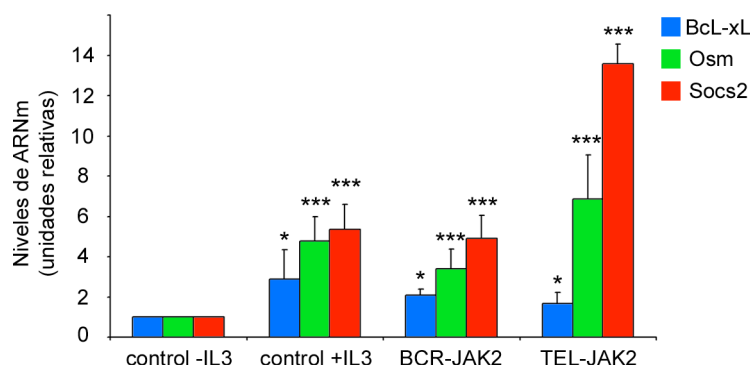


Figura 20: Niveles de expresión relativa de ARNm de Bcl-xL, Osm y Socs2 en células Ba/F3 control, Ba/F3 BCR-JAK2 y Ba/F3 TEL-JAK2 por qPCR. Las barras de colores representan los cambios en la expresión respecto a las células control con valores de cada gen relativizados a la expresión del gen control *Gapdh* (media \pm desviación típica; n= 3; t de student, * p<0,05; *** p<0,001)

8.- El inhibidor de JAK2 TG101209 anula la activación de BCR-JAK2 y la fosforilación de STAT5

TG101209 es un inhibidor de JAK2 potente y altamente selectivo que induce parada de ciclo celular y apoptosis en células Ba/F3 que expresan la mutación JAK2^{V617F} dentro del contexto de leucemia mieloide aguda a través de la inhibición de la fosforilación de la proteína mutada así como de su sustrato STAT5 (Pardanani et al., 2007b). Para evaluar la eficacia de este inhibidor en nuestro modelo celular se realizaron ensayos de cinética dosis-respuesta tratando las células Ba/F3 BCR JAK2, Ba/F3 TEL-JAK2 (control positivo) o las Ba/F3 control (control negativo) con TG101209 durante 12h y se compararon con las mismas líneas tratadas con el vehículo (DMSO). Este ensayo demostró que las células que expresan las proteínas quiméricas BCR-JAK2 y TEL-JAK2 son altamente susceptibles al tratamiento con TG101209 comparadas con las células

control + IL-3 en términos de viabilidad (Figura 21). En base a estos resultados se escogió la concentración 1 μ M como dosis óptima para los experimentos de apoptosis.

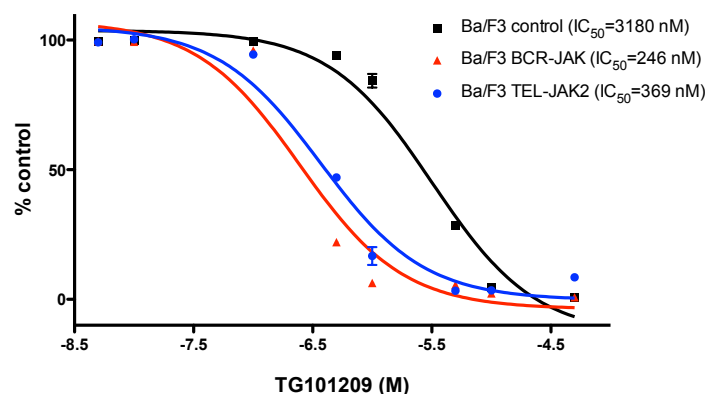


Figura 21: Curva sigmoideal dosis-respuesta de viabilidad respecto al inhibidor TG101209 de las células Ba/F3-control en presencia de IL-3 y Ba/F3-BCR-JAK2 y Ba/F3-TEL-JAK2 en ausencia de IL-3. Se muestra la viabilidad celular relativa al control sin tratamiento para concentraciones crecientes de inhibidor TG101209 (donde el eje X es el logaritmo de la concentración). Se representan los valores de media aritmética de 3 experimentos independientes.

Para corroborar estos datos a nivel molecular se prepararon lisados proteicos de células que habían sido tratadas con 1 μ M TG101209 y se inmunoprecipitaron con un anticuerpo anti-fosfotirosina (pTyr). Después se revelaron con un anticuerpo anti-Jak2 para evaluar el grado de fosforilación de Jak2 (Figura 22). El análisis densitométrico mostró una inhibición del 76% para BCR-JAK2 frente a un 10% para TEL-JAK2. Las diferencias observadas podrían deberse al mayor nivel de expresión de TEL-JAK2 y por tanto haría falta una mayor concentración de fármaco para conseguir una tasa de inhibición similar. Esta inhibición de la fosforilación también se observa en la proteína JAK2 endógena.

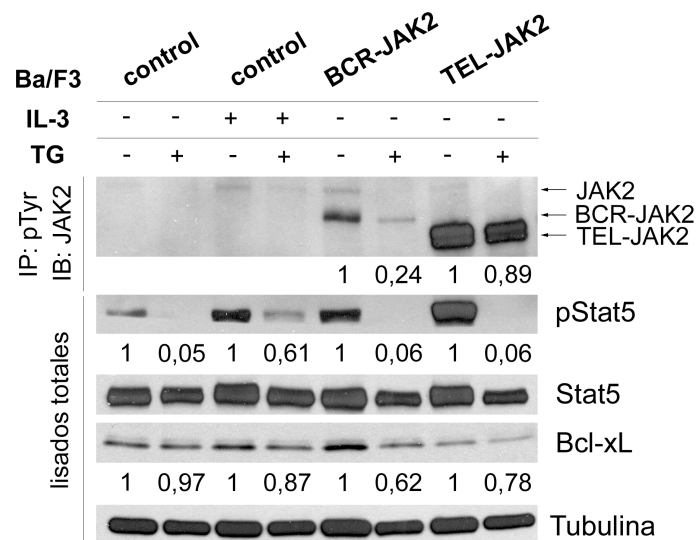


Figura 22: Análisis por Western Blot del estado de fosforilación de las líneas celulares Ba/F3-control, Ba/F3 BCR-JAK2 y Ba/F3 TEL-JAK2 después de 12h de exposición a 1 μ M TG101209. Los lisados celulares se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti-p-Tyr, y se revelaron con anticuerpo anti-JAK2 (panel superior). Los lisados celulares totales se hibridaron con anticuerpos anti-p-STAT5, anti-STAT5, anti-BCL-XL y anti-tubulina como control de carga (panel inferior). Se muestran los valores de inhibición con respecto al control con DMSO, al cual se dio el valor 1.

La inhibición de la fosforilación también se traduce a nivel de STAT5, llegando a ser casi absoluta en el caso de BCR-JAK2 y TEL-JAK2. En lo que concierne a Bcl-xL la inhibición es menor aunque alcanza el 40% en la línea Ba/F3 BCR-JAK2.

Por último, a nivel transcripcional se detectó una disminución de la expresión en los genes *Socs2*, *Osm* y *Bcl-xL* en las líneas BCR-JAK2 y TEL-JAK2 (Figura 23).

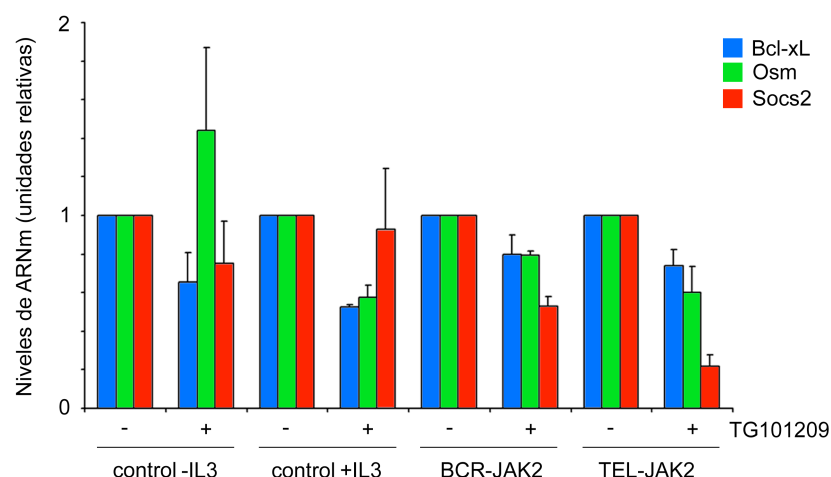


Figura 23: Niveles de expresión relativa de ARNm de los genes *Bcl-xL*, *Osm* y *Socs2* en células Ba/F3-control, Ba/F3 BCR-JAK2 y Ba/F3 TEL-JAK2. La expresión se analizó por qPCR después de 12h de la exposición a 1 μ M TG101209. Las barras representan los cambios en la expresión respecto a las células control con valores de cada gen relativizados a la expresión del gen control *Gapdh* (media \pm desviación típica; n= 3)

Todos estos datos confirman la hipótesis de que el inhibidor TG101209 impide la activación de STAT5 y la subsiguiente inducción de genes diana (*Socs2*, *Osm* Y *Bcl-xL*) mediada por STAT5 debido a la inhibición de ambas proteínas quiméricas y el JAK2 endógeno en las líneas control.

9.- El inhibidor TG101209 induce muerte celular por apoptosis en la línea Ba/F3 BCR-JAK2

Para dilucidar el mecanismo de muerte celular inducido por el inhibidor TG101209 se realizaron ensayos de unión a anexina-V y se analizaron las muestras por citometría de flujo (Figura 17). El tratamiento de las células Ba/F3 BCR-JAK2 con 1 μ M TG101209 durante 24h produce un aumento de aproximadamente el 80% de células positivas a anexina-V en comparación con el control tratado con vehículo (DMSO). Como era de esperar, el inhibidor TG101209 apenas tiene efecto sobre las células control Ba/F3 control +IL3, lo que evidencia que la inducción de apoptosis en la línea que expresa BCR-JAK2 es consecuencia de la inhibición de la tirosín-quinasa (Figura 24).

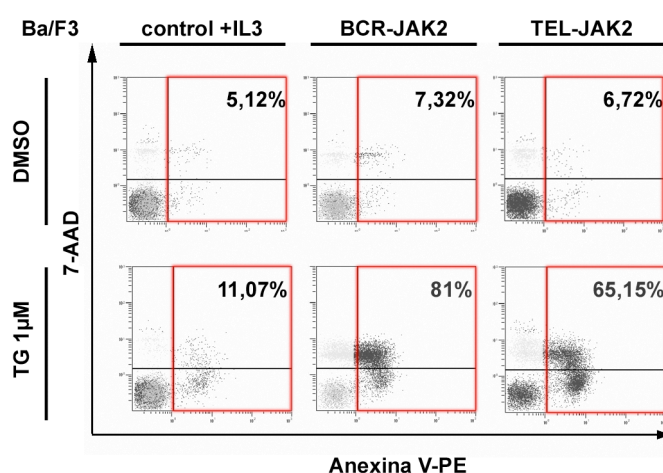


Figura 24: Experimento representativo de ensayo de apoptosis de las líneas celulares Ba/F3 control + IL-3, Ba/F3 BCR-JAK2 y Ba/F3 TEL-JAK2 medido por citometría de flujo. La apoptosis se midió como el porcentaje de células que muestran marcaje para anexina-V en la superficie de la membrana celular, y se representa enmarcada en rojo. Las células Ba/F3-control creciendo sin IL-3 no se muestran porque son incapaces de crecer en un medio que carece de esta interleuquina.

La tasa de apoptosis en la línea que expresa TEL-JAK2 es ligeramente menor que en las BCR-JAK2 en concordancia con la menor susceptibilidad al fármaco puesta de manifiesto en los ensayos de dosis-respuesta (Figura 25). Estas diferencias también podrían deberse a los elevados niveles de expresión proteica en esta línea.

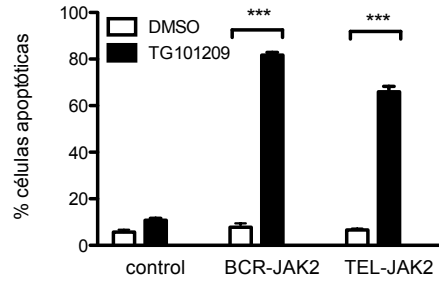


Figura 25: Cuantificación del porcentaje de células apoptóticas mediante citometría de flujo. La apoptosis se midió como el porcentaje de células Ba/F3 control, BCR-JAK2 y TEL-JAK2 que muestran marcaje para anexina-V en la superficie de la membrana celular. Los valores se representan como la media \pm desviación típica de tres experimentos independientes (n=3) (análisis de varianza de 2 vías, *** p<0,001)

10.- La expresión de BCR-JAK2 en células Ba/F3 induce la formación de tumores en ratones inmunodeficientes

La capacidad que tienen determinadas proteínas de fusión de propiciar la generación de tumores en modelos de ratones inmunodeficientes ha sido ya descrita (Puttini et al., 2006). Con objeto de evaluar el potencial tumorigénico de BCR-JAK2 se inyectaron subcutáneamente células Ba/F3-control y Ba/F3 BCR-JAK2 en los flancos izquierdo y derecho respectivamente de ratones inmunodeficientes OlaHsd-Foxn1^{nu/nu}. A los 20 días ya se hicieron visibles en los flancos derechos de todos los animales unos tumores de considerable tamaño. Como era previsible, las células Ba/F3 control no fueron capaces de propagarse en este modelo y por tanto no produjeron tumores en los flancos izquierdos (Figura 26). Puesto que las células que expresan BCR-JAK2 co-expresan también la EGFP se analizaron los tumores usando un fotodetector digital.

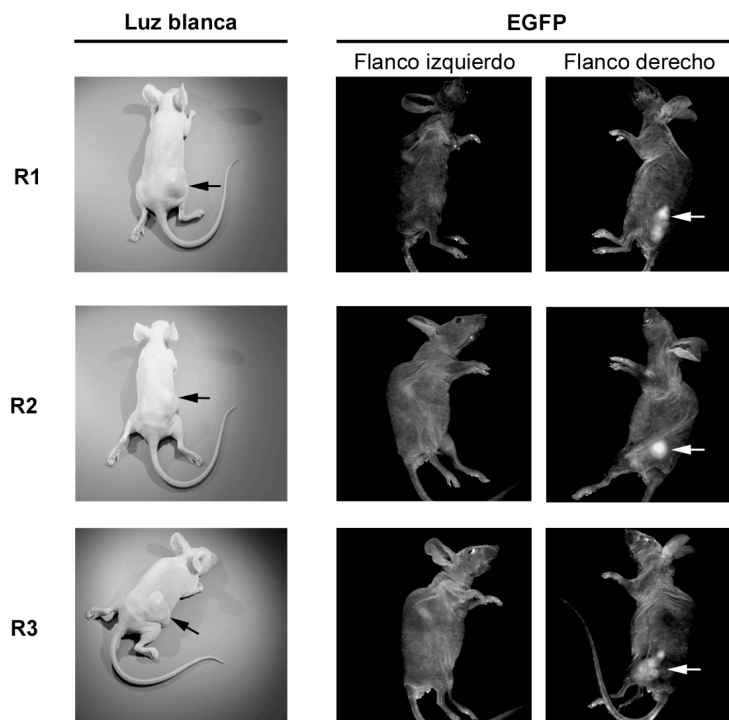


Figura 26: Ensayo de tumorigénesis con ratones inmunodeficientes inyectados subcutáneamente con 10^7 células Ba/F3 control (flanco izquierdo) y Ba/F3 BCR-JAK2 (flanco derecho). Panel izquierdo: los ratones desarrollaron tumores sólo en el flanco derecho (flechas negras), donde se inyectaron células Ba/F3 BCR-JAK2. Panel derecho: los tumores subcutáneos expresaban EGFP en el flanco derecho de los animales (flechas blancas) tal y como muestran las fotografías capturadas en una fotoestación digital. En ningún caso se detectó señal EGFP en los flancos izquierdos, donde se inyectaron células Ba/F3 control.

El análisis de las células del tumor por citometría de flujo confirmó estos resultados: al menos el 50% de células del tumor expresaban la EGFP y por tanto provenían de las células inyectadas. El 50% restante de células que conformaban el tumor y no expresaban la EGFP podrían ser células accesorias al tumor provistas por el huésped tales como tejido conectivo, epitelial y endotelial (Figura 27). Además, tampoco podrían excluirse fenómenos de silenciamiento de la expresión por metilación en el promotor que regula la expresión del transgén BCR-JAK2.

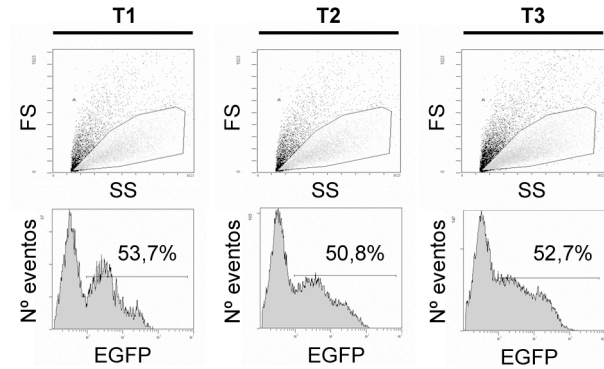


Figura 27: Análisis por citometría de flujo de las células de los tumores subcutáneos disgregados. Los tumores formados en ratones inmunodeficientes se disgregaron con colagenasa C y se analizaron por citometría de flujo. Se muestra la expresión de EGFP en más de la mitad de la población. FS: dispersión frontal; SS: dispersión lateral.

Por último, para confirmar la expresión de la proteína quimérica se hizo una RT-PCR sobre ARN de las células tumorales con oligonucleótidos específicos para BCR-JAK2 y se observó una clara amplificación con el tamaño del fragmento esperado en todos los casos analizados (Figura 28).

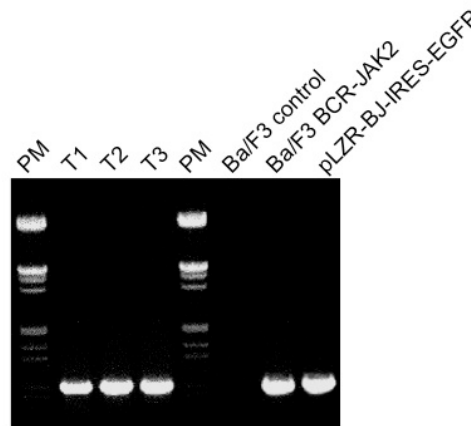


Figura 28: Análisis por RT-PCR de la expresión de BCR-JAK2 en los tumores obtenidos de ratones inoculados con células Ba/F3-control y Ba/F3 BCR-JAK2. Se emplearon muestras de ARN de tres tumores diferentes y se compararon con ARN de células Ba/F3 control y Ba/F3 BCR-JAK2, usadas como control negativo y positivo, respectivamente. pLZR-BJ-IRES-EGFP: plásmido retroviral portador de BCR-JAK2 usado también como control positivo. PM: marcador de peso molecular.

Todo este conjunto de datos confirma la capacidad oncogénica de BCR-JAK2.

11.- Los progenitores hematopoyéticos de ratón que expresan BCR-JAK2 muestran un aumento en la proliferación y la supervivencia

Con objeto de comprobar si las células progenitoras hematopoyéticas de ratón que expresan BCR-JAK2 poseen mayor capacidad de proliferación que las células control se realizaron ensayos de transducción de células Lin⁻ seleccionadas a partir de médula ósea total de ratones Balb/c. Posteriormente se diseñaron ensayos de expansión *in vitro* que confirmaron que las células que expresan BCR-JAK2 muestran mayor capacidad de proliferación comparada con las células control, como se puede observar en la Figura 29. De hecho, las células que expresan BCR-JAK2 son capaces de proliferar en cultivo *in vitro* durante más de tres meses, mientras que las células control no suelen superar los 30 días. Esta serie de datos confirma que además de conferir ventaja proliferativa y transformar líneas hematopoyéticas, BCR-JAK2 aumenta la capacidad de proliferación y supervivencia de progenitores hematopoyéticos de ratón.

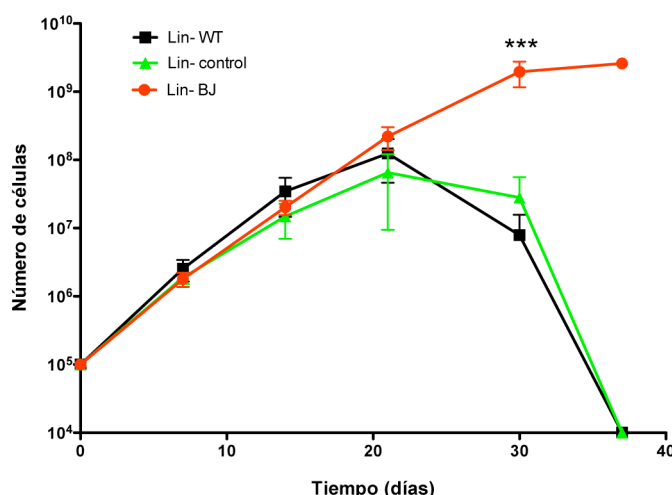
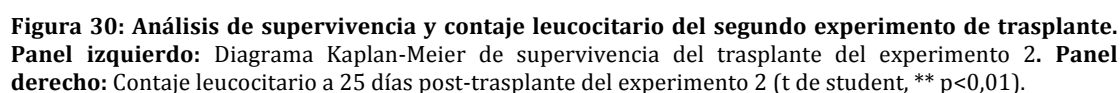


Figura 29: Ensayo de proliferación de células progenitoras de ratón Lin⁻ transducidas con los vectores retrovirales pLZR-IRES-EGFP (control) o pLZR-BJ-IRES-EGFP. Los progenitores hematopoyéticos de ratón transducidos con BCR-JAK2 mostraron una capacidad de expansión muy incrementada respecto al control. Los valores se representan como media \pm desviación típica (n=3) (t de student, *** p<0,001)

12.- La expresión de BCR-JAK2 en progenitores hematopoyéticos de ratón induce un síndrome mieloproliferativo *in vivo*

El siguiente objetivo fue verificar si la fusión BCR-JAK2 era responsable de la leucemia en el paciente. Para comprobar los efectos de la expresión ectópica del gen de fusión BCR-JAK2 en un

En el segundo experimento, todos los animales trasplantados (7 de 7) desarrollaron un síndrome mieloproliferativo con una latencia de 35 días y altos contajes de leucocitos en sangre periférica (Figura 30).



78

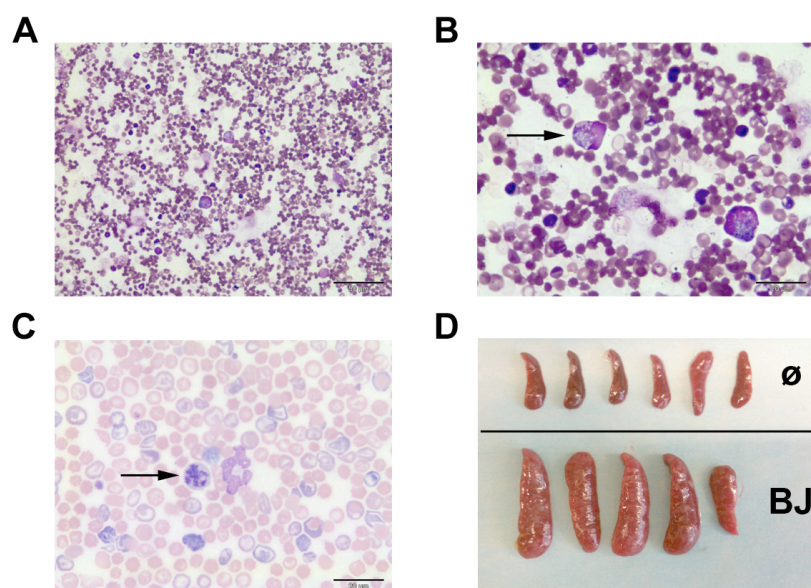


Figura 31: Análisis histopatológico de tejidos y órganos de los ratones trasplantados en el experimento 2. **A)** Extensión de sangre periférica ratón BJ1 (40x) con mieloblastos; **B)** Extensión de sangre periférica ratón BJ1 (100x) con mielocitos basófilos; **C)** Extensión de sangre periférica ratón BJ4 (100x) con presencia de megacariocitos precursores de plaquetas y reticulocitos; **D)** Imagen de los bazo del experimento 2 en el punto final. Las extensiones se tiñeron con hematoxilina/eosina.

En el tercer experimento, 3 animales de los 7 trasplantados desarrollaron una neoplasia mieloide en el sistema hematopoyético (Figura 32).

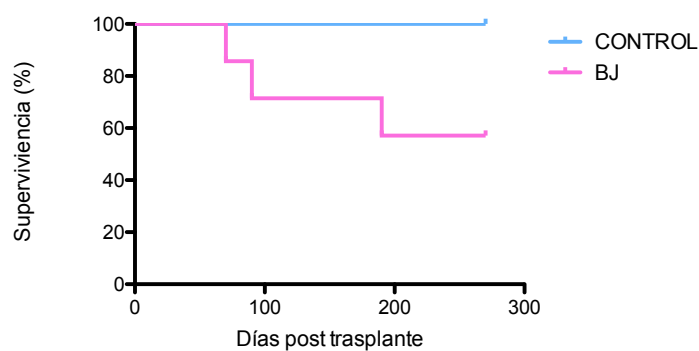


Figura 32: Diagrama Kaplan-Meier de supervivencia del trasplante del experimento 3.

Esta neoplasia se caracterizaba por la presencia en sangre periférica de precursores mieloides inmaduros y un elevado número de polimorfonucleares neutrófilos (Figura 33). Sin embargo, en este experimento de trasplante no se produjo esplenomegalia en ningún caso.

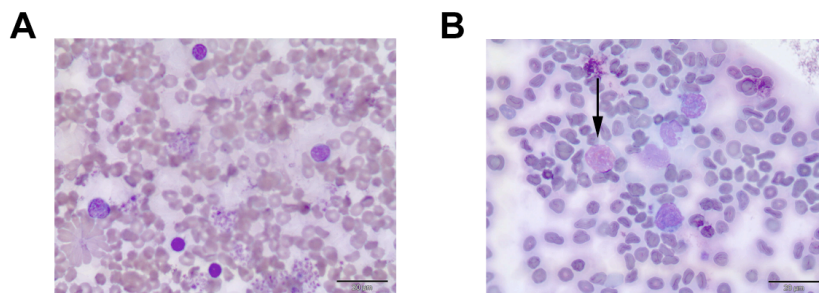


Figura 33: Análisis histopatológico de los ratones trasplantados en el experimento 3. A) Extensión de sangre periférica con presencia de precursores de la serie blanca (100x). **B)** Extensión de sangre periférica con aumento de polimorfonucleares neutrófilos (100x). Las extensiones se tiñeron con hematoxilina/eosina.

También pudimos observar una cierta dificultad en la capacidad de cicatrización de heridas de los animales trasplantados, característica descrita en modelos de leucemia y síndrome mielodisplásico (Visco et al., 2008, Kaden et al., 1979), aunque no conseguimos demostrar ninguna correlación con los niveles de plaquetas en sangre.

13.- Análisis inmunofenotípico en los tejidos hematopoyéticos

Con objeto de caracterizar más ampliamente el tipo de enfermedad causada por la expresión de BCR-JAK2 en el compartimento hematopoyético, se realizaron análisis de inmunofenotipo de los tejidos implicados usando anticuerpos específicos de moléculas de superficie para marcar los linajes mieloide (Gr-1/Mac-1) y linfoide de tipo B y T (B220 y CD3).

En el experimento 1, a 30 días post trasplante (dpt) destacó un ratón con una mayoría de linfocitos B en sangre periférica. Para determinar el estadio de maduración de los linfocitos B se realizaron marcajes por citometría de flujo con los anticuerpos B220, CD19, IgM, CD43 y CD25 que permitían conocer su estado de diferenciación. Así, los resultados del análisis en el animal BJ2 mostraron que esta población de linfocitos B eran B220⁺, CD19⁺, IgM⁺, CD43⁺ y CD25^{low} (Figura 34).

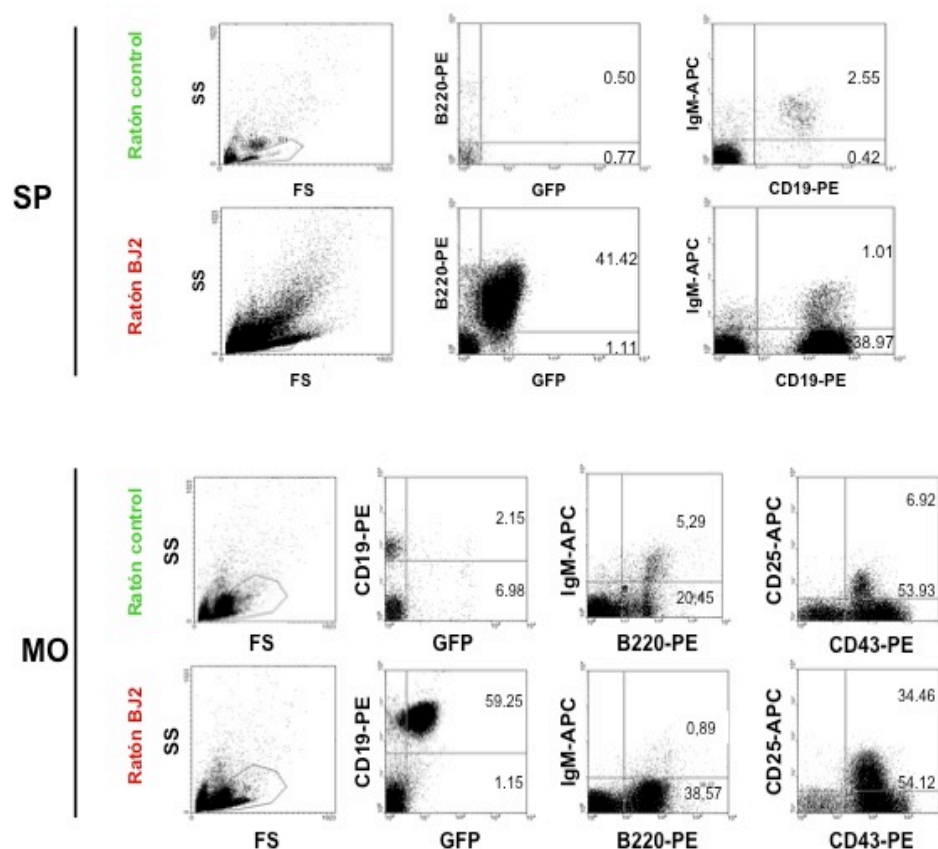


Figura 34: Caracterización inmunofenotípica de sangre periférica y médula ósea del ratón B220-PE del experimento 1. El análisis se realizó por citometría de flujo usando anticuerpos de linaje y estadio de maduración anti-B220, anti-CD19, anti-IgM, anti-CD43, anti-CD25 (todos ellos marcados con ficoeritrina, PE). FS (*forward scatter*): dispersión frontal; SS (*side scatter*): dispersión lateral.

Este inmunofenotipo corresponde según la ontogenia de linfocitos B a un estadio de maduración intermedio entre pro-B y pre-B.

En el experimento 2, los resultados de la caracterización inmunofenotípica a 25 dpt mostraron un desbalance en los linajes de sangre periférica de ratones B220-PE a favor de la serie granulomacrofágica, que representaba aproximadamente el 95% de la sangre periférica total (figura 35).

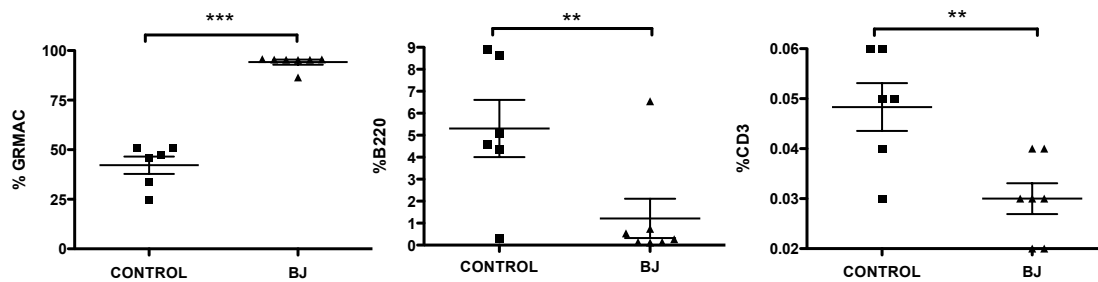


Figura 35: Caracterización inmunofenotípica de sangre periférica con anticuerpos anti-Gr-1 y anti-Mac1 (linaje mieloide), anti-B220 (linaje linfocito B) y anti-CD3 (linaje linfocito T) del experimento 2 a 25 dpt. El diagrama de dispersión muestra que el 95% de células circulantes en ratones BJ son granulocitos/macrófagos. (t de student, *** $p < 0,001$; ** $p < 0,05$)

Este desbalance se estaba produciendo en detrimento de los otros linajes (linfocitos B y T), cuya representación en sangre periférica de ratones BJ era muy escasa.

Es interesante subrayar la ausencia de expresión de EGFP en los tejidos de ratones trasplantados con progenitores que expresan BCR-JAK2 (Figura 36). Este silenciamiento de la expresión podría atribuirse a la metilación de la secuencia reguladora U3 y se detallará más tarde.

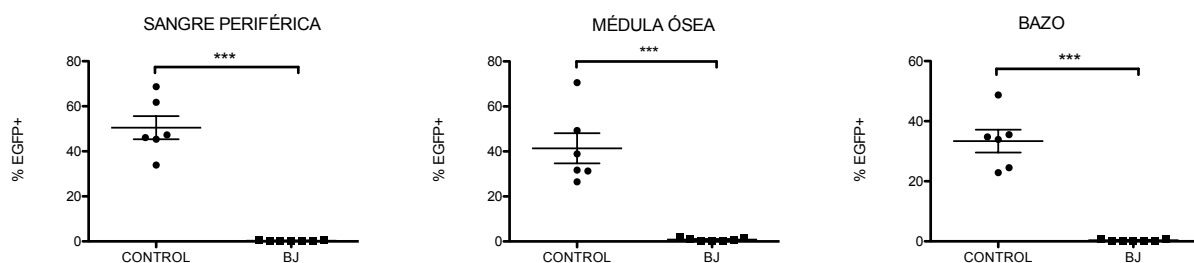


Figura 36: Expresión de EGFP en sangre, médula y bazo para los dos grupos del trasplante del experimento 2 por citometría de flujo. Los diagramas de dispersión muestran la ausencia total de expresión de EGFP en los tejidos hematopoyéticos. (t de student, *** $p < 0,001$).

En el experimento 3 no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos del trasplante a nivel de sangre periférica en las poblaciones mieloides, pero sí un cambio moderado en las poblaciones linfoides (Figura 37).

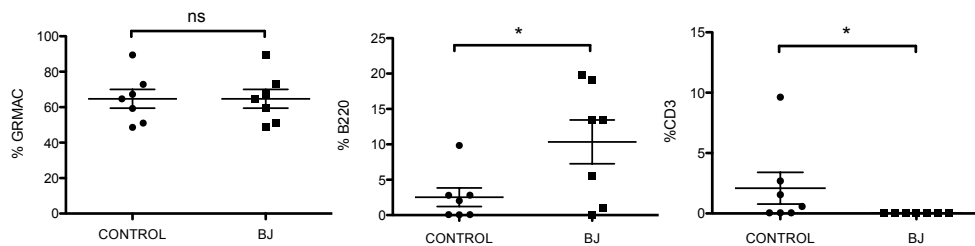


Figura 37: Caracterización inmunofenotípica de sangre periférica en los dos grupos del experimento 3 a 30 dpt. (t de student, ns: no significativo, * $p < 0,05$).

Sin embargo, sí se observaron diferencias significativas en las poblaciones de granulocitos/macrófagos de médula ósea entre los dos grupos de ratones a 30 días post-trasplante (Figura 38), lo que sugería un comportamiento similar al observado en el experimento 2.

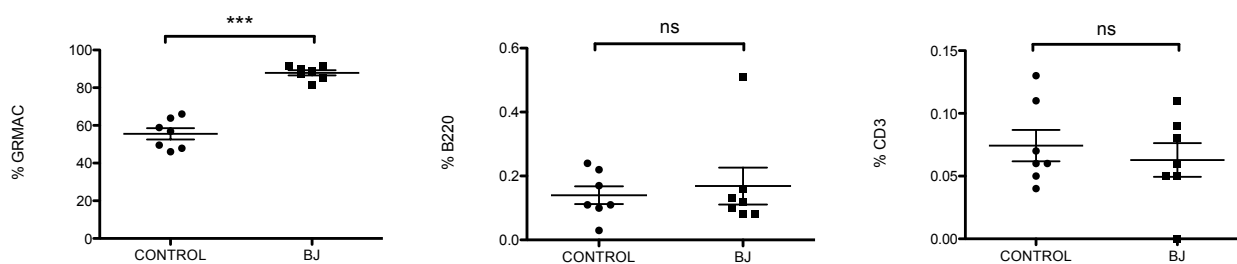


Figura 38: Diagramas de dispersión para la caracterización inmunofenotípica de médula ósea en los dos grupos del experimento 3 a 30 dpt. Se observan diferencias significativas en las poblaciones granulo-macrofágicas (t de student, *** $p < 0,001$; ns: no significativo)

Además, se procedió a ampliar la caracterización de estas células incluyendo un marcaje para determinar el estadio de maduración de los progenitores hematopoyéticos con los marcadores Lin⁻, Sca-1 y c-kit en muestras de médula ósea a 30 dpt. Para profundizar aún más se dispuso de los marcadores CD16/32 (FcγR) y CD34 para determinar las distintas subpoblaciones dentro del compartimento de progenitores: progenitor mieloide común (PMC, Lin⁻ Sca-1⁻, c-kit⁺, FcγR⁻, CD34⁺), progenitor eritroide megacariocítico (PEM, Lin⁻ Sca-1⁻, c-kit⁺, FcγR⁻, CD34⁻) y progenitor granulo-macrofágico (PGM, Lin⁻ Sca-1⁻, c-kit⁺, FcγR⁺, CD34⁺). La Figura 39 muestra un caso representativo en el que se observa un incremento de los PMC en los ratones que expresan BCR-JAK2.

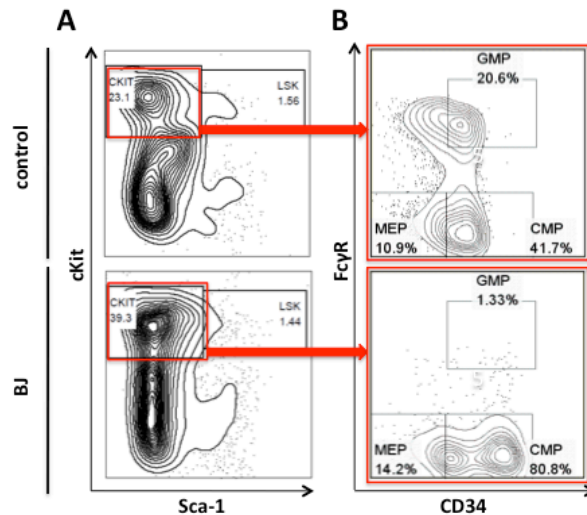


Figura 39: Diagrama de puntos por citometría de flujo de un experimento representativo. Se muestra el compartimento Lin/Sca-1/c-Kit/FcγR/CD34 para dos ratones representativos de los grupos control y BJ. En el panel **A)** se muestra la selección de células Lin⁻, Sca-1⁺, c-Kit⁺, mientras que en el panel **B)** se representan las subpoblaciones de progenitores dentro de esta población: GMP (PGM), CMP (PGM) y MEP (PEM).

En la Figura 40 podemos observar en el análisis de los grupos del trasplante un moderado aumento en la población de progenitores LSK de los ratones BJ. Además, se observa un aumento muy significativo en el PMC a expensas de una drástica reducción del PGM.

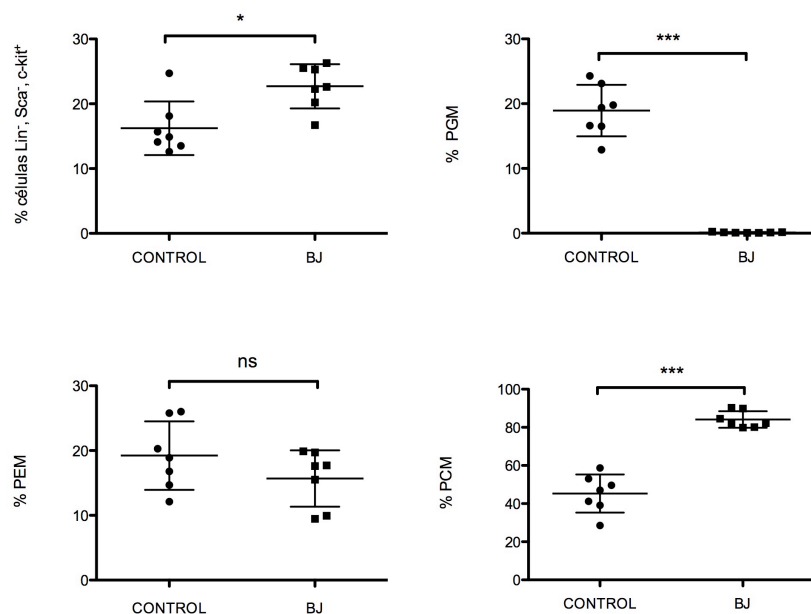


Figura 40: Diagramas de dispersión de la caracterización inmunofenotípica de médula ósea en los dos grupos del experimento 3 a 30 dpt. El marcaje revela un aumento significativo de progenitores en los ratones BJ y una descompensación de los progenitores de linaje a favor del PMC. (t de student; ns: no significativo; * p<0,05; ***p<0,001)

Para dilucidar qué población mieloide estaba incrementada se realizó un marcaje independiente de Gr-1 y Mac-1 en el análisis de 60 dpt. Los resultados confirmaron un notable aumento en la población Gr-1⁺/Mac-1⁺, y el estudio por separado de las dos subpoblaciones indicó que prácticamente el 90% eran Mac-1⁺ (Figura 41).

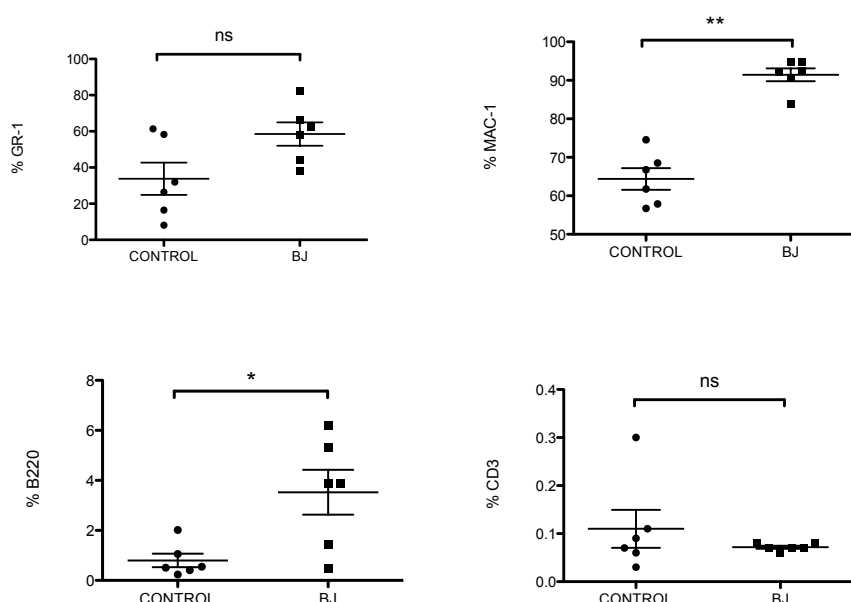


Figura 41: Diagramas de dispersión de la caracterización inmunofenotípica de sangre periférica en los dos grupos del experimento 3 a 60 dpt. Se observan dobles positivos Gr-1/Mac-1, y aproximadamente un 90% de células de sangre periférica expresa Mac-1. También se observan diferencias significativas en la expresión del marcador linfoide B220 (t de student, * p<0,05; ** p<0,01; ns: no significativo).

Las diferencias observadas a 30 dpt en los progenitores comprometidos a linaje no volvieron a observarse a 60 dpt, como puede apreciarse en la Figura 42.

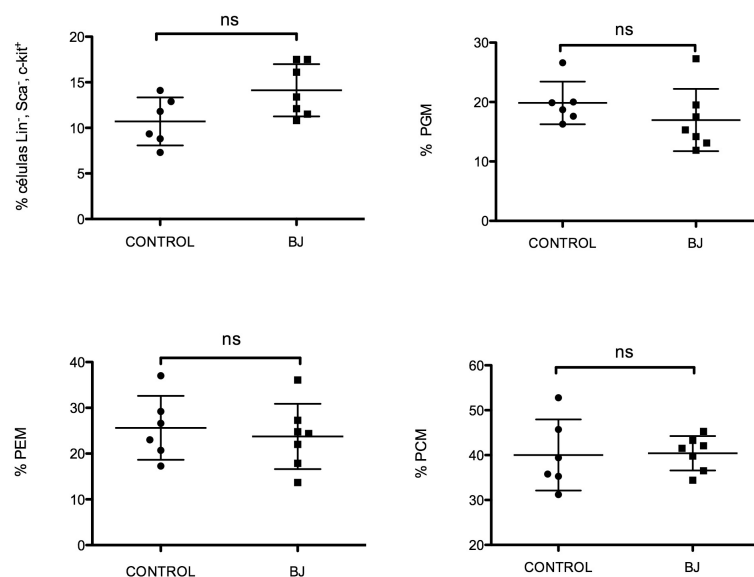


Figura 42: Caracterización inmunofenotípica de progenitores en médula ósea a 60 dpt. Se utilizó una mezcla de anticuerpos anti-Lin, anti-Sca1, anti-c-kit, anti-FcγR y anti-CD34 para analizar las distintas subpoblaciones de progenitores. No se observaron diferencias significativas entre los dos grupos del trasplante. (t de student, ns: no significativo).

Las diferencias en el linaje granulo-macrofágico no se volvieron a reproducir a lo largo del tiempo restante en los animales trasplantados, ya que sólo quedaban con vida los que no desarrollaron enfermedad y estaban sanos. Sólo a 180 dpt se observó una caída ligeramente significativa del linaje linfocitario del grupo BJ con respecto al control (Figura 43).

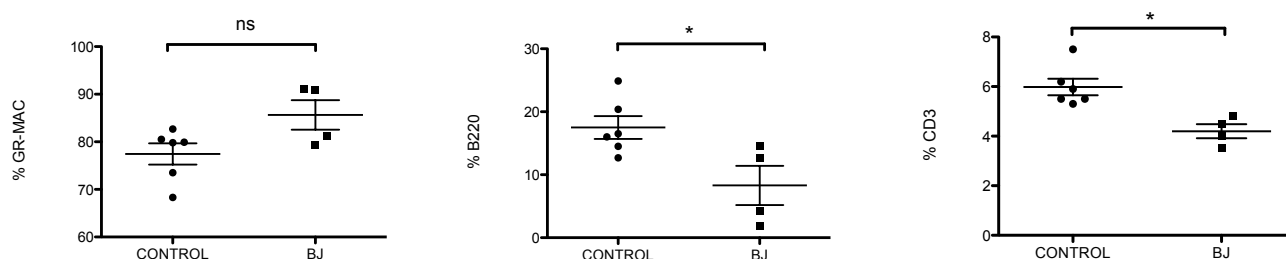


Figura 43: Diagramas de dispersión de la caracterización inmunofenotípica de médula ósea a 180 dpt. Se observan ligeras diferencias en las poblaciones linfocitarias, pero no en la población mieloide (t de student, * $p < 0,05$; ns: no significativo).

En el momento del sacrificio de punto final a 270 dpt no se observaron diferencias significativas en ningún linaje de ninguno de los tejidos analizados (sangre periférica, médula ósea y bazo), lo que sugiere que aquellos animales que habían sobrevivido no tenían ningún síntoma de enfermedad.

14.- Análisis del número de copias del provirus en los ratones trasplantados con progenitores hematopoyéticos transducidos

Con objeto de determinar y cuantificar la integración de copias del provirus en los tejidos afectados de los ratones trasplantados, se realizaron qPCRs con oligonucleótidos específicos para amplificar los genes EGFP y titina de ratón, según un protocolo previamente validado (Charrier et al., 2011).

En el primer experimento de trasplante se analizó ADN procedente de una muestra de médula ósea (sólo un ratón desarrolló la enfermedad) y se determinó que había 0,45 copias de provirus integradas por célula.

En el experimento 2 se analizaron muestras de ADN de bazo y se confirmó que todos los animales tenían copias del vector integradas, aunque este número era variable según cada animal (Figura 44).

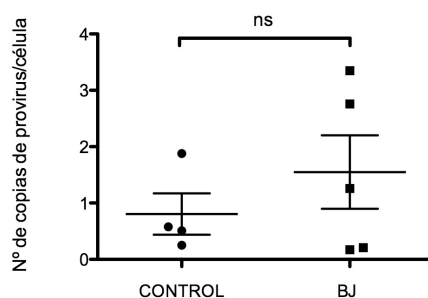


Figura 44: Análisis de integración de copias del vector retroviral en muestras del experimento 2 de trasplante. Se calcularon las copias del gen EGFP y se normalizó con las copias del gen titina (t de student, ns: no significativo).

En el experimento 3 no pudieron analizarse dos ratones muertos por leucemia (BJ3 y BJ7), mientras que el tercer ratón muerto (BJ4) mostró 0,45 copias de provirus integrado por célula. Por otro lado, los ratones BJ2, BJ5 y BJ6 no tenían copias, lo que explica que no hayan desarrollado ningún tipo de neoplasia (Figura 45).

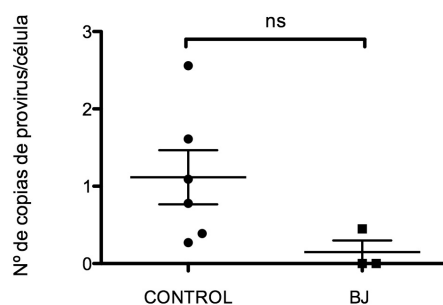


Figura 45: Análisis de integración de copias del vector retroviral en muestras del experimento 3 de trasplante. Se calcularon las copias del gen EGFP y se normalizó con las copias del gen titina (t de student; ns: no significativo).

Estos resultados confirman que el desarrollo de la enfermedad en estos ratones está asociado a la presencia del transgén.

15.- Expresión de BCR-JAK2 *in vivo*

Debido a que la expresión del gen marcador EGFP parecía apagada o silenciada en dos de los tres experimentos, era necesario comprobar que el fenotipo observado en los ejemplares trasplantados era el resultado de la expresión de la proteína quimérica. Para ello se diseñaron oligonucleótidos y sonda TaqMan específicos para un amplicón que comprende el punto de rotura entre BCR y JAK2, y se puso a punto una qPCR para determinar la expresión del transgén en los tejidos hematopoyéticos de los ratones. En el experimento 2 se comprobó la expresión de BCR-JAK2 en las muestras de bazo, que puede observarse en la Figura 46.

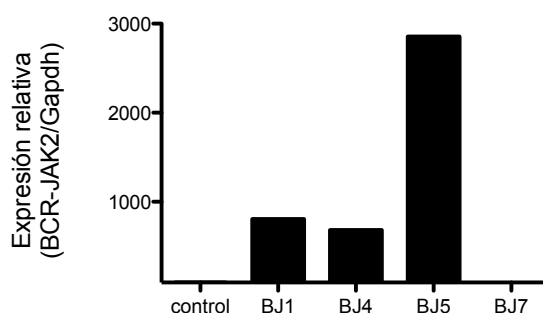


Figura 46: Niveles de expresión de ARNm de BCR-JAK2 en bazos de animales del experimento 2 por qPCR. Se representa el valor $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Los valores están normalizados con la expresión del gen endógeno Gapdh.

Además, sobre estas mismas muestras se realizaron ensayos de inmunofluorescencia con anticuerpos anti-JAK2 para demostrar que la proteína expresada es funcional y se encuentra localizada en el citoplasma de las células infiltradas en el bazo, tal y como muestra la Figura 47.

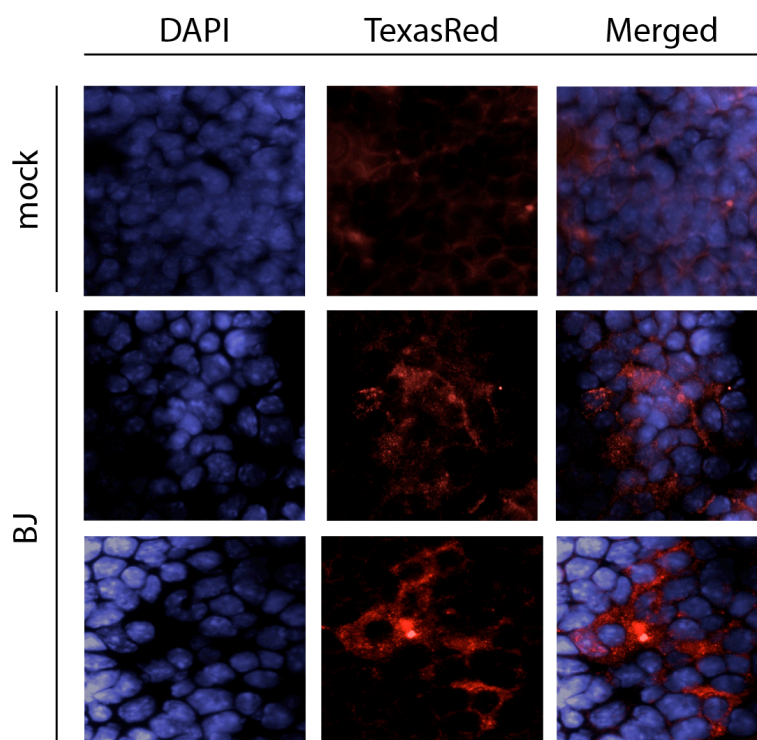


Figura 47: Análisis de inmunofluorescencia de cortes de bazo de ratones del experimento 2 usando un anticuerpo anti-JAK2 y visualizados por microscopía de fluorescencia (20x). El nivel de JAK2 endógeno de los bazos control (control) es muy bajo, lo que permite localizar la expresión de la fusión génica BCR-JAK2 en el citoplasma de los esplenocitos.

Por último, en el experimento 3 se realizaron ensayos de qPCR sobre muestras de ARNm de progenitores de médula ósea cultivados *ex vivo* en medio semisólido (metilcelulosa). Tal y como indica la Figura 48 existe una expresión variable del transgén, de 1,4 a 12 veces, con respecto a los ratones control.

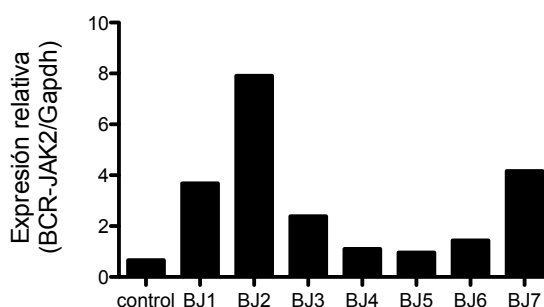


Figura 48: Niveles de ARNm de BCR-JAK2 en progenitores de médula ósea del experimento 3 a 30 dpt. Se representa el valor $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Los valores están normalizados con la expresión del gen endógeno Gapdh.

Estos resultados confirman que a pesar de no poder detectar la expresión de la EGFP, la fusión génica BCR-JAK2 se expresa *in vivo* y puede inducir la aparición de la enfermedad en los animales trasplantados.

16.- Estudio de metilación de la secuencia reguladora de la expresión del transgén

Una de las características más llamativas de la mayoría de los experimentos de trasplante descritos en esta memoria es la ausencia de células que expresan la EGFP en el caso de células transducidas con el vector RV: BJ-EGFP. No obstante sí se ha podido apreciar un fenotipo claro en los ratones trasplantados, así como la expresión de la proteína quimérica *in vivo*. Por ello se recurrió a un compuesto químico demetilante, el 5-aza-citidina, para comprobar si el mecanismo de silenciamiento de la expresión de EGFP podía ser la metilación. Así, se expuso un cultivo de células progenitoras de ratón Lin⁻ previamente transducidas con el transgén BCR-JAK2 al agente demetilante 5-aza-citidina (AZA) durante 72 horas. El resultado fue un aumento de la expresión de EGFP de más de un 50% con respecto a las células control, como puede observarse en la Figura 49.

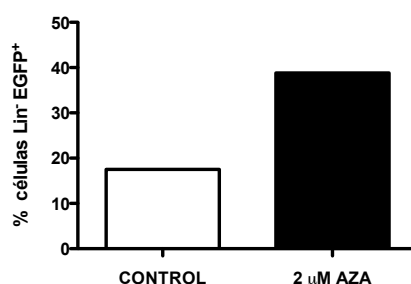


Figura 49: Cuantificación de células Lin⁻ EGFP⁺ en un cultivo *in vitro* de células primarias de ratón transducidas con BCR-JAK2 y expuestas a un tratamiento con el agente demetilante 5-aza-citidina. Las células se cultivaron en presencia del agente durante 72h con una concentración 2μM.

Para comprobar estos resultados preliminares se realizó un análisis de la secuencia U3 del provirus, que es la responsable de la actividad transcripcional de los transgenes integrados. Este análisis se hizo por tratamiento con bisulfito y PCR anidada sobre muestras de ADN extraído de bazo. El análisis de las secuencias reveló que al menos el 80% de las islas CpG (secuencias susceptibles de metilación) estaban modificadas (Figura 50), lo que confirma nuestra hipótesis de que el transgén se encuentra silenciado porque la secuencia que controla su expresión está metilada y por tanto transcripcionalmente menos activa.

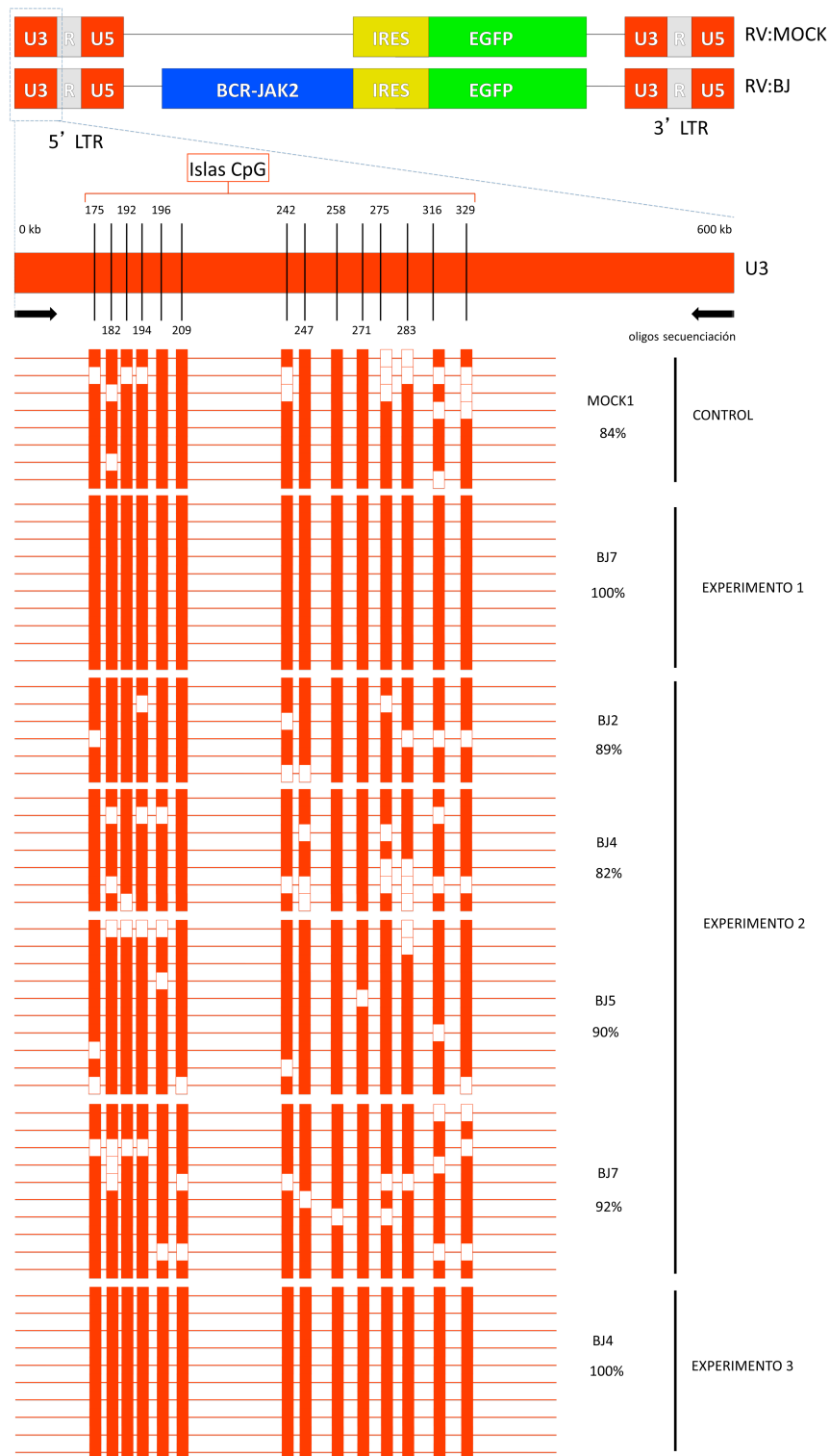


Figura 50: Análisis de metilación de la secuencia reguladora U3 del provirus empleado en los tres experimentos de trasplante de médula ósea. La secuencia contiene 14 islas CpG. El ADN extraído de los bazos de los ratones trasplantados se sometió a un tratamiento con bisulfito para modificar las islas CpG no metiladas. Posteriormente se realizó una PCR anidada para amplificar la secuencia marcada entre flechas y se analizó la secuencia del producto de PCR para determinar el porcentaje de metilación en función de los dinucleótidos modificados.

Como resumen del número de ratones trasplantados en cada experimento, así como la integración de provirus, expresión del transgén, caracterización inmunofenotípica y anatomopatológica se muestra la Tabla 2.

	GRUPOS	COPIAS	EXPRESIÓN	INMUNOFENOTIPO			ANATOMOPATOLOGIA	
				MO	SP	BZ	SP	BZ
EXP1	5 control	n/d	n/d	normal	normal	normal	n/d	n/d
	5 BJ	VCN 0,45 (1/5)	EGFP+	B220 (1/5)	B220 (1/5)	B220 (1/5)	n/d	Esplenomegalia (1/5)
EXP2	6 control	VCN 0,8 (4/6)	EGFP+	normal	normal	normal	normal	normal
	7 BJ	VCN 1,55 (5/5)	BCR-JAK2+	GRMAC (7/7)	GRMAC (7/7)	GRMAC (7/7)	Progenitores mieloides (7/7)	Esplenomegalia (7/7)
EXP3	7 control	VCN 1,11 (5/7)	EGFP+	normal	normal	normal	normal	normal
	7 BJ	VCN 0,45 (1/4)	BCR-JAK2+	GRMAC (7/7)	GRMAC (7/7)	GRMAC (7/7)	Progenitores mieloides (7/7)	Normomegalia (7/7)

Tabla 6: Cuadro resumen de los experimentos de trasplante de médula ósea. Se muestran el número de animales de cada grupo empleados en cada experimento, la integración de copias del provirus, la expresión del transgén BCR-JAK2, el inmunofenotipo y el análisis anatomopatológico en los tejidos hematopoyéticos. Entre paréntesis se muestra el número de animales positivos para un determinado fenotipo del total de animales analizados. VCN: número de copias del vector; MO: médula ósea; SP: sangre periférica; BZ: bazo; n/d: datos no disponibles.

Todos estos resultados sugieren que aquellos animales en los que han injertado células transducidas con la fusión génica BCR-JAK2 han desarrollado un síndrome linfo/mielo-proliferativo en el ratón, de forma similar a lo que ocurre en el paciente.

DISCUSIÓN

Este trabajo de investigación toma como punto de partida un paciente del Hospital Universitario de La Princesa cuyo cuadro clínico ha sido descrito en Material y Métodos. El cariotipo complejo, la citología y el inmunofenotipo de aspirado de médula ósea demostraron la presencia de linfoblastos y justificaron la búsqueda del reordenamiento BCR-ABL en la Unidad de Biología Molecular.

Sin embargo la PCR estándar en pacientes con LAL para amplificar el transcrito m BCR-ABL dio como resultado un producto de menor tamaño, que al ser secuenciado reveló que BCR no estaba fusionado a ABL sino a JAK2. Los análisis moleculares posteriores confirmaron que este transcrito mantenía el marco de lectura abierto y por tanto sería capaz de expresarse. Por último, los estudios de hibridación *in situ* fluorescente sobre núcleos interfásicos de células de médula ósea confirmaron la presencia de la traslocación entre BCR y JAK2 .

El papel de las mutaciones de ganancia de función de JAK2 en síndromes mieloproliferativos ha sido descrito en enfermedades como la policitemia vera, la mielofibrosis y la trombocitemia esencial (James et al., 2005b, Kralovics et al., 2005, Levine et al., 2005, Baxter et al., 2005) y se ha detallado en la Introducción de este trabajo. También se han descrito reordenamientos de JAK2 con otros genes cuyos productos quiméricos conllevan procesos neoplásicos, tales como *TEL-JAK2* (Lacronique et al., 1997) y *SEC31A-JAK2* (Van Roosbroeck et al., 2011). Por otro lado, el papel de BCR en la oligomerización de ABL en el caso de BCR-ABL también ha sido reseñado (McWhirter et al., 1993) y ha demostrado ser esencial en las rutas de activación de quinasas de fusión (Pendergast et al., 1989, Campbell et al., 1990).

Por todo lo anteriormente mencionado parecía lógico proponer la hipótesis de que una fusión génica entre *BCR* y *JAK2* podría tener características oncogénicas similares a las observadas en otras tirosín-quinasa de fusión como BCR-ABL y la más recientemente descrita TEL-JAK2.

El presente estudio ha perseguido demostrar las propiedades oncogénicas de BCR-JAK2 *in vitro*, caracterizando la vía de señalización intracelular implicada, las moléculas que median y regulan la respuesta y los genes activados en consecuencia, así como generar un modelo experimental celular donde poder evaluar la efectividad de inhibidores de tirosín-quinasa que podrían utilizarse en un futuro como terapia antileucémica. Por otra parte, también nos hemos propuesto sentar las bases de un modelo de ratón en el que demostrar que BCR-JAK2 tiene propiedades oncogénicas *in vivo*, evaluar si la expresión de esta proteína quimérica es suficiente para desencadenar un proceso neoplásico y caracterizar el tipo de patología asociada. Además, este modelo animal también podría servir en el futuro como una herramienta sencilla y útil en estudios preclínicos para validar el uso de terapias moleculares dirigidas.

1.-PACIENTE CON LAL-B PORTADOR DE BCR-JAK2

En esta memoria de tesis se describe el caso clínico del único paciente descrito portador de la fusión génica BCR-JAK2 diagnosticado con leucemia aguda linfoblástica de tipo B y cariotipo complejo. En la literatura hasta ahora se han descrito otros 7 casos de pacientes con este transcrito dando lugar a distintos cuadros clínicos y patologías, como muestra la Tabla 7.

CARIOTIPO	DIAGNÓSTICO	AÑO	REFERENCIA
t(9;22)(p24; q11.2)	Leucemia mieloide crónica (LMC)	2005	<i>Griesinger et al.</i>
t(9;22)(p24;q11)	Leucemia mieloide aguda (LMA)	2008	<i>Cirmena et al.</i>
t(9;22)(p24;q11)	Leucemia mieloide crónica (LMC)	2008	<i>Lane et al.</i>
t(9;18;22)(p23;p11.3;q11.2)	Síndrome mieloproliferativo	2011	<i>Impera et al.</i>
Cariotipo complejo: 49XY,+X,+2,+4,-9,-11,+19,add(19)(q13),+20,-22,+mar	Leucemia aguda linfoblástica (LAL-B)	2012	<i>Cuesta-Dominguez et al.</i>
t(9;22)(p24; q11.2)	Síndrome mieloproliferativo similar a LMC	2012	<i>Elnaggar et al.</i>
ins(9;22)(q11;p13p24)	Leucemia mieloide crónica atípica (LMCa)	2013	<i>Xu et al.</i>
t(9;22)(p24; q11.2)	Leucemia mieloide crónica atípica (LMCa)	2013	<i>Bellesso et al.</i>

Tabla 7: Revisión bibliográfica sobre la fusión génica BCR-JAK2. Se muestran el cariotipo y tipo de patología diagnosticada, referencias y año de publicación.

Como se puede observar nuestro caso contrasta con el resto de pacientes en los que esta fusión génica está mayoritariamente asociada a LMC y LMA. Es interesante remarcar cómo distintos reordenamientos dan lugar a proteínas quiméricas semejantes que afectan al linaje mieloide, y sin embargo nuestro paciente pone de manifiesto que la translocación BCR-JAK2 no se restringe únicamente a este linaje.

Por otro lado, aproximadamente dos tercios de los pacientes adultos con leucemia aguda linfoblástica (LAL) no cuentan con marcadores moleculares o citogenéticos asociados como el Ph⁺ en la LMC (Faderl et al., 2000). Así, aunque parece que *BCR-JAK2* es relativamente infrecuente, es posible que existan pacientes con síndrome linfo- o mieloproliferativo y Ph⁻ que sean portadores de esta translocación. Por ello hemos desarrollado una qPCR con sonda FRET para detectar el

tránsito BCR-JAK2 como técnica de diagnóstico molecular y seguimiento de la enfermedad mínima residual (EMR) .

En el paciente la EMR indetectable coincide en el tiempo con la respuesta genética y clínica completa, que se mantiene hasta el día de hoy. Esto podría deberse a la rápida respuesta molecular al tratamiento estándar de quimioterapia con prednisona, vincristina y daunorubicina conseguida con anterioridad al trasplante autólogo de médula ósea (Mortuza et al., 2002).

Por último, parece interesante recordar que este paciente fue diagnosticado con una LAL pre-B, y cómo nuestro primer experimento de trasplante de médula ósea en ratón desencadenó un síndrome linfoproliferativo con inmunofenotipo pro-B. El modelo generado en este trabajo reproduce no sólo la leucemia linfocítica sino también la mielocítica, dependiendo del progenitor en el que se produce la translocación. Este resultado es similar al obtenido en otros modelos de trasplante con genes de fusión, como es el caso de TEL-JAK2, que puede conducir a una enfermedad mixta linfocítica/mieloproliferativa (Schwaller et al., 1998) o leucemia linfoblástica de tipo T (Carron et al., 2000) para la misma construcción quimérica, y esto puede ser debido en parte a que la transducción retroviral no está limitada a un linaje o un estadio de diferenciación determinado de los progenitores diana. Por otra parte hay que tener muy en cuenta que el paciente poseía un cariotipo complejo en el momento del diagnóstico y, por tanto, puede tener multitud de eventos o *hits* no detectados que podrían concurrir para dar el fenotipo patológico observado. En este sentido, es importante destacar que en el caso de pacientes con BCR-ABL se ha descrito que la inestabilidad genómica producida por esta oncoproteína puede generar eventos secundarios responsables del paso de fase crónica a crisis blástica, y también de la resistencia a los inhibidores (Skorski, 2008).

2.- BCR-JAK2 ES UNA PROTEÍNA TIROSÍN-QUINASA PLENAMENTE FUNCIONAL Y CONSTITUTIVAMENTE ACTIVA EN AUSENCIA DE SEÑALES DE PROLIFERACIÓN

La proteína BCR-JAK2 contiene el dominio de hélice enrollada de BCR fusionado al dominio tirosín-quinasa de JAK2, tal y como reveló la secuenciación del producto de PCR sobre la muestra de médula ósea del paciente al diagnóstico. La proteína JAK2 endógena en condiciones normales se fosforila gracias a la oligomerización producida tras la unión de los factores de crecimiento a los receptores de citoquinas implicados en la vía JAK/STAT (Parganas et al., 1998). Sin embargo, se ha descrito que en determinados tipos de leucemia y tumores sólidos puede darse la oligomerización de estas tirosín-quinasa de forma independiente de la unión al ligando correspondiente, como revisaron Tefferi y Gilliland (Tefferi and Gilliland, 2007). Nuestra hipótesis de partida considera que en BCR-JAK2 la activación del dominio quinasa de JAK2 se debe a la oligomerización mediada por el dominio de hélice enrollada de BCR, tal y como ocurre con la activación constitutiva de BCR-ABL (McWhirter et al., 1993) y de la misma forma que TEL cuando se encuentra fusionado a JAK2 (Golub et al., 1996).

En el caso de BCR-ABL, la estructura de la quinasa ABL ha sido ampliamente caracterizada, lo que ha permitido determinar su función tanto en condiciones normales como patológicas (Panjarian et al., 2013). La resolución cristalográfica y la mutagénesis dirigida de algunos aminoácidos han identificado residuos claves de esta quinasa, como la Ile¹⁶⁴ del dominio SH2, de forma que estos mutantes son catalíticamente inactivos y resultan en una supresión de la actividad tanto de ABL como de BCR-ABL, sugiriendo un papel regulador positivo en la función quinasa (Filippakopoulos et al., 2008, Grebien et al., 2011).

En cuanto a la otra mitad de la proteína quimérica, BCR, se han descrito algunas funciones relevantes para esta proteína en condiciones fisiológicas, como su actividad GTPasa (Diekmann et al., 1991), su capacidad de interactuar con la cromatina (Wetzler et al., 1995) y con la proteína GRB2 implicada en la vía de RAS (Pendergast et al., 1993), así como su actividad serín-treonín quinasa (Maru and Witte, 1991). Sin embargo su papel en la oligomerización resulta fundamental cuando está fusionado a tirosín-quinasa (McWhirter et al., 1993, Guo et al., 1998). De un modo muy similar actuaría la proteína TEL, cuyo papel en la oligomerización de oncoproteínas de fusión también es fundamental (Golub et al., 1996).

A la hora de caracterizar el mecanismo de acción de BCR-JAK2 así como las vías de señalización intracelular implicadas se hizo necesario obtener una línea celular que expresase de forma estable esta proteína. Para ello usamos como modelo la línea prolinfocítica de ratón Ba/F3, que ha sido ampliamente utilizada en estudios de transformación y oncogénesis (Li et al., 1999, Rutherford et al., 2001, Lacronique et al., 2000, Million et al., 2004, Pierce et al., 2012) porque en condiciones normales necesita IL-3 como estímulo para proliferar. Así, se puede evaluar la

capacidad transformadora de la proteína transducida si las células se vuelven independientes de este factor de crecimiento. De esta forma generamos dos líneas celulares Ba/F3: una línea control que sólo expresaba la EGFP y otra que expresaba BCR-JAK2 y EGFP a través de una construcción bicistrónica.

Los datos iniciales de este trabajo muestran cómo la línea Ba/F3 es transformada por BCR-JAK2, haciéndose independiente de factores de crecimiento. En estas células STAT5 se fosforila constitutivamente y es capaz de translocar al núcleo celular. Estos hallazgos son semejantes a la activación constitutiva de la vía JAK/STAT descrita para BCR-ABL y TEL-JAK2, sugiriendo que STAT5 juega un papel clave tanto en el proceso de transformación celular como en el mantenimiento de la enfermedad debido a proteínas tirosín-quinasa de fusión o el virus Abelson (Hoelbl et al., 2006, Ye et al., 2006, Hoelbl et al., 2010). Por otra parte, hay estudios que asocian altos niveles de STAT5 con la resistencia a los inhibidores y con la progresión de la enfermedad (Warsch et al., 2011).

Las proteínas de fusión que participan en procesos leucémicos se suelen localizar en el citoplasma, muy íntimamente ligadas a la cara interna de la membrana celular, donde desarrollan su función activando efectores de la cascada de señalización. Este es el caso de TEL-JAK2 (Schwaller et al., 1998) y BCR-ABL (Wetzler et al., 1993). En nuestro caso hemos detectado la proteína BCR-JAK2 en el citoplasma y pSTAT5 en el núcleo de la línea celular Ba/F3 BCR-JAK2. Sin embargo, recientemente se ha demostrado la posibilidad de que JAK2 pudiera mediar algunas de sus capacidades oncogénicas dentro del núcleo de las células hematopoyéticas. Hay trabajos que demuestran que JAK2 está en el núcleo de diversas líneas celulares, así como en el núcleo de células CD34⁺ que expresan la mutación activadora JAK2^{V617F} aisladas de un paciente con mielofibrosis post-policitémica (Dawson et al., 2009). Un trabajo posterior de Rinaldi et al. sugirió que JAK2^{V617F} se localizaría preferentemente en el núcleo de las células hematopoyéticas, y así ocurre en la línea leucémica humana K562, donde se demostró que había mayores niveles de quinasa mutada en el núcleo comparado con la línea control (Senyuk et al., 2009). La explicación funcional de la localización nuclear de los JAKs todavía no está clara, aunque ciertos estudios sostienen que son capaces de fosforilar la histona H3, modificando así la accesibilidad epigenética y la transcripción de múltiples loci incluyendo oncogenes como *Myc* y *Lmo2* (Dawson et al., 2009, Rui et al., 2010).

En cuanto a las consecuencias funcionales de la activación constitutiva de BCR-JAK2 sabemos que en células hematopoyéticas normales STAT5 es activado por una amplia batería de citoquinas que promueven programas de diferenciación, proliferación y supresión de la apoptosis gracias a la regulación de la fosforilación o la expresión de los miembros de la familia génica *Bcl-2* (Broome et al., 1995). El efecto antiapoptótico mediado por la activación de STAT5 en los progenitores hematopoyéticos puede explicarse parcialmente por la regulación transcripcional del gen *Bcl-xL* en respuesta a la IL-3 en células sanas (Amarante-Mendes et al., 1998), y por BCR-ABL en el caso de células transformadas de LMC (Horita et al., 2000). En este contexto hemos

detectado expresión de *Bcl-xL* en células Ba/F3 BCR-JAK2, lo que sugiere que la vía JAK2/STAT5/BCL-XL podría ser responsable de esta capacidad de proliferación y supervivencia en ausencia de IL-3. También hemos detectado un aumento en la expresión de los genes diana de STAT5 *Socs2* y *Osm* (Yoshimura et al., 1996, Basham et al., 2008, Warsch et al., 2011), que en sinergia con los efectos antiapoptóticos ejercidos por BCL-XL podrían ser coadyuvantes en la resistencia a la apoptosis y la proliferación en ausencia de señales.

Es importante resaltar que la expresión de *BCL-XL* estaba muy aumentada en las muestras del paciente al diagnóstico comparándolas con las que se tomaron una vez alcanzada la remisión, como ya se ha descrito para una variedad de cánceres humanos, incluyendo la leucemia mieloide aguda (LMA) (Pallis et al., 1997). Además, en trabajos previos de nuestro laboratorio se realizaron ensayos de actividad del promotor de *BCL-XL* con luciferasa en células HEK293T transfectadas transitoriamente y demostraron que BCR-JAK2 es capaz de inducir la expresión controlada de este promotor.

Sin embargo, no podemos excluir la posible participación de BCR en los procesos de activación, más allá de la descrita oligomerización. Como hemos reseñado anteriormente, existen estudios que demuestran que BCR puede participar en dos vías fundamentales de la señalización intracelular, como son la fosforilación a través del dominio serín/treonín-quinasa y la unión a proteínas G a través del dominio GAP, que le confieren un papel activo en la vía de RAS. En el futuro sería importante evaluar si las distintas moléculas fusionadas a la quinasa JAK2 pueden modificar el comportamiento de la proteína quimérica a través de efectores específicos en la transducción de señales. Así, mientras que en el caso de BCR-JAK2 encontramos una sobreexpresión de los genes *Osm*, *Socs2* y *Bcl-xL*, en el caso de TEL-JAK2 se ha descrito la inducción de otros genes diana de STAT5 como son *Socs1* y *Cis* (Monni et al., 2001). Además, nosotros hemos demostrado en este trabajo que TEL-JAK2 también es capaz de expresar los genes *Osm*, *Socs2* y *Bcl-xL* en ausencia de IL-3.

Por otro lado, cabe destacar que aunque no hemos realizado ningún estudio sobre la posible interacción de BCR-JAK2 con determinadas proteínas del citoesqueleto, sí hemos observado cómo las células Ba/F3 que expresan BCR-JAK2 crecen típicamente agregadas en racimos de células. En relación con esta observación la literatura recoge ampliamente cómo las células de pacientes con LMC Ph⁺ exhiben múltiples aberraciones en la función del citoesqueleto: incremento de motilidad y alteraciones en moléculas de adhesión (Gordon et al., 1987, Bazzoni et al., 1996, Kramer et al., 1999, Wertheim et al., 2003). Esto se traduce fisiológicamente en una liberación prematura de progenitores de la médula ósea y por consiguiente una acumulación de células inmaduras en los tejidos hematopoyéticos periféricos. Por todo ello, sería interesante confirmar si BCR-JAK2 o sus efectores son capaces de modular procesos como el reclutamiento de integrinas o la unión a fibronectina, tal y como ocurre con BCR-ABL (Li et al., 2007b).

3.- TG101209 INHIBE LA ACTIVACIÓN DE JAK2

Uno de los mayores hitos en el tratamiento de la neoplasias hematológicas ha sido el uso de STI-571/Imatinib/Gleevec en la LMC, que está diseñado para unirse competitivamente al bolsillo de unión a ATP del dominio quinasa de BCR-ABL y de esa manera suprimir su actividad enzimática desregulada. Este fármaco ha demostrado ser una terapia muy efectiva en el tratamiento de estas leucemias y hoy en día es el tratamiento estándar de primera línea en pacientes con LMC Ph+ (Druker et al., 1996, Druker et al., 2006).

Tras el éxito conseguido con la LMC se ha producido un aumento exponencial en la búsqueda y obtención de inhibidores selectivos de tirosín-quinasas implicadas en otros tipos de leucemias y síndromes mieloproliferativos (Levitzki, 2013), que podrían ser utilizados en futuras terapias.

Para demostrar la eficacia y especificidad de dichos inhibidores en las células que expresan BCR-JAK2 nos centramos en el estudio de un nuevo compuesto: el inhibidor específico de JAK2 TG101209 (TargeGen/Sanofi-Aventis). Este inhibidor mostró una notable capacidad de inhibir la fosforilación de ambas proteínas BCR-JAK2 y JAK2 endógena en la línea celular transformada Ba/F3 BCR-JAK2. Esta inhibición se hizo patente también a nivel de la activación de STAT5 y la subsiguiente expresión de sus genes diana. Por último, era necesario comprobar el efecto final del tratamiento con el inhibidor, siendo el resultado la iniciación del programa de muerte celular por apoptosis. Como cabía esperar, el tratamiento con el inhibidor en la línea Ba/F3 control mostró una inhibición menor de JAK2 endógeno y pSTAT5, así como a nivel transcripcional de *Bcl-xL*. En cuanto a los genes *Socs2* y *Osm* también se detectó una ligera disminución de su transcripción. La tasa de apoptosis en la línea control fue también mucho menor, probablemente debido a que la activación por IL-3 tiene un papel protector frente a la apoptosis (Horita et al., 2000). De este modo queda demostrado que el inhibidor es específico y que sólo afecta a las células que expresan BCR-JAK2, mientras que las células no transformadas apenas sufren los efectos proapoptóticos derivados del tratamiento.

De los 49 residuos de tirosina que posee JAK2 se han identificado numerosas mutaciones con efectos diversos sobre la actividad catalítica. Es el caso del residuo Tyr¹⁰⁰⁷ del codo de activación en el dominio SH2, cuya mutación resulta en la eliminación total de actividad (Wilson-Rawls et al., 1996, Feng et al., 1997). Cabe señalar que es precisamente este residuo Tyr¹⁰⁰⁷ el que utiliza BCR-ABL para fosforilar a JAK2 y por tanto desempeña una función clave en el proceso de transformación de leucemias BCR-ABL⁺ (Xie et al., 2001). Recientemente se han descrito otras mutaciones activadoras e inactivadoras en el dominio quinasa e incluso en el dominio FERM (McDoom et al., 2008, Feener et al., 2004, Argetsinger et al., 2010, Sayyah et al., 2011) que hacen de JAK2 un candidato ideal para la terapia molecular dirigida.

Todos los resultados obtenidos *in vitro* nos llevan a proponer un mecanismo de acción como el que se muestra en la Figura 51. De este modo, en condiciones basales BCR-JAK2 se encontraría

localizada en el citoplasma constitutivamente fosforilada en ausencia de estímulos y activando funcionalmente a STAT5. Asumimos en este modelo que en situación fisiológica no existe una ausencia de citoquinas y por tanto la proteína JAK2 endógena también se fosforila a través del receptor de IL-3 y señala vía STAT5. La dimerización de p-STAT5 permite su translocación al núcleo, donde se une a las regiones reguladoras de la expresión de los genes diana *Bcl-xL*, *Osm* y *Socs2* y cuyo resultado es la supervivencia y la proliferación de la célula. En el caso de suministrar el tratamiento con un inhibidor específico de JAK2, como el TG101209, éste bloquearía el sitio de unión a ATP del dominio quinasa de BCR-JAK2 y también de JAK2 endógeno, de manera que no pueden fosforilarse y por tanto la vía de señalización queda interrumpida. El resultado del tratamiento con TG101209 en células que portan la fusión génica es la muerte celular programada por apoptosis.

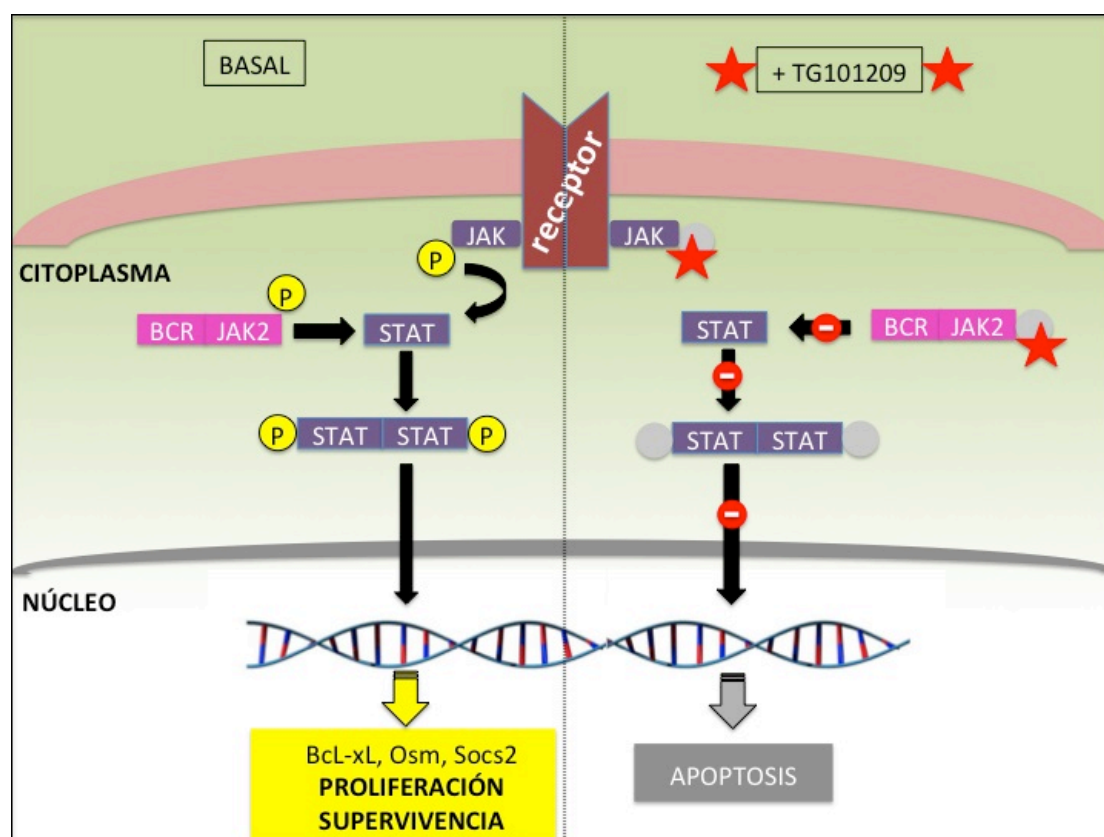


Figura 51: Mecanismo de acción propuesto para BCR-JAK2 en condiciones basales y bajo tratamiento con el inhibidor específico de JAK2 TG101209.

4.- BCR-JAK2 POSEE CAPACIDAD ONCOGÉNICA *IN VIVO*

La leucemia es una neoplasia hematológica que implica un desorden clonal que afecta a las células de médula ósea y sangre periférica. Se consideran cuatro tipos mayoritarios de leucemia en función del desarrollo y progresión de la enfermedad (aguda ó crónica) y del linaje hematopoyético al que afecta (mieloide ó linfoide). El cuadro clínico incluye típicamente altos contajes de células inmaduras que desplazan a la población de células sanas. Éstas células inmaduras son disfuncionales y por tanto el sistema inmune puede verse seriamente comprometido. Además, estas células inmaduras (blastos) circulantes en sangre periférica son capaces de extravasar y colonizar nuevos tejidos.

La etiología de la leucemia es desconocida en la mayor parte de los casos pero como el resto de tipos de cáncer, tiene su punto de partida en mutaciones del ADN que pueden dar lugar a oncogenes, protooncogenes o genes supresores de tumores. En el caso de la leucemia más común entre adultos, la leucemia mieloide crónica (LMC) es causada por la translocación BCR-ABL, cuya actividad tirosín-quinasa desregulada es necesaria y suficiente para desencadenar y mantener en el tiempo el fenotipo observado (Daley et al., 1990, Kelliher et al., 1990, Heisterkamp et al., 1990).

Bajo esta premisa, y una vez demostradas las propiedades transformadoras *in vitro*, el paso lógico y natural era desarrollar un modelo animal donde comprobar si BCR-JAK2 es *per se* capaz de reproducir una neoplasia con características semejantes a las observadas en los pacientes.

Como paso previo al modelo de trasplante de progenitores de médula ósea realizamos un ensayo preliminar que pudiera confirmar lo observado en la línea celular Ba/F3. El experimento consistió en inocular por vía subcutánea estas células en ratones inmunodeficientes, cuya idoneidad para estudiar la capacidad de propagación de líneas tumorales y confirmar la capacidad de generar tumores ha sido ya reseñada por Van Etten (Van Etten, 2001). Este ensayo muestra cómo la línea celular transformada Ba/F3 BCR-JAK2 es capaz de generar tumores subcutáneos en un modelo de ratón inmunodeficiente, y además permitió confirmar la expresión de la fusión génica BCR-JAK2 *in vivo*. Es importante destacar que aunque el análisis de los tumores por citometría de flujo mostró un 50% de células EGFP⁺, el carácter encapsulado de los tumores subcutáneos podría incluir células de tejido conectivo, epitelial y endotelial provistas por el huésped y que no expresan la EGFP. Por otro lado, los ensayos de proliferación de progenitores de ratón transducidos con los vectores retrovirales mostraron cómo las células que expresan BCR-JAK2 poseen mayor capacidad de supervivencia y proliferación *in vitro*. Estos resultados sustentan la idea que BCR-JAK2 también tiene propiedades transformantes a nivel de células madre hematopoyéticas y no sólo en líneas celulares establecidas como Ba/F3.

Existen varias aproximaciones a la hora de establecer un modelo adecuado para el estudio de leucemogénesis *in vivo*, tal y como se ha detallado en la Introducción de este trabajo. De todos ellos, escogimos el de trasplante de progenitores de médula ósea transducidos con vectores

retrovirales por las ventajas que ofrecía en cuanto a limitar la expresión al compartimento hematopoyético de forma relativamente sencilla y mimetizar la mutación somática que aparece en el paciente.

En esta memoria se compilan tres experimentos de trasplante de médula ósea transducida retroviralmente con BCR-JAK2 con un total de 21 animales trasplantados. De ellos, más del 50% desarrollaron una neoplasia con un desenlace letal en una ventana de tiempo de 25 a 190 días post-trasplante. A este respecto se ha descrito que la expresión de BCR-ABL en progenitores hematopoyéticos trasplantados en ratón provoca una muerte por crisis blástica en aproximadamente 21 días (Dash et al., 2002), mientras que TEL-JAK2 muestra un período de latencia de 4 a 22 semanas (Carron et al., 2000). Por ello, y en ausencia de trabajos en los que se haya realizado un ensayo quinasa *in vitro* para evaluar su capacidad a la hora de fosforilar sustratos, estos datos apuntan a que BCR-JAK2 tiene una potencia oncogénica intermedia. Por supuesto, la progresión de la enfermedad en estos modelos *in vivo* también depende de la eficacia de transducción de los progenitores trasplantados.

El fenotipo observado en los animales trasplantados que desarrollaron una patología como consecuencia de la expresión de BCR-JAK2 ha resultado mayoritariamente de linaje mieloide, con tan sólo un caso de linaje linfóide B. Aunque las mutaciones y reordenamientos de JAK2 han sido frecuentemente asociadas a la estirpe granulо-macrofágica (Baxter et al., 2005, Levine et al., 2007), también se han publicado trabajos en los que el fenotipo resultante es linfóide de tipo T (Carron et al., 2000), y otros que informan de linfoma de Hodgkin (Van Roosbroeck et al., 2011). Nosotros proponemos que el síndrome linfoproliferativo observado en tan sólo un caso en este trabajo es consecuencia de la transducción clonal de un progenitor que ya estaba comprometido al linaje linfóide (PCL, progenitor común linfóide). Es interesante recordar que este experimento reprodujo la misma enfermedad del paciente, que fue diagnosticado con una LAL pre-B, aunque si tenemos en cuenta el cariotipo complejo descrito consideramos probable que su fenotipo también pueda deberse al efecto cooperativo de uno o más eventos de mutación o reordenamiento. En cualquier caso, algunos autores proponen que existen varios factores que podrían ser claves a la hora de determinar el fenotipo causado por este tipo de aberraciones en la función de JAK2: el tipo de aberración (mutación puntual o reordenamiento), la dosis (homocigosidad o heterocigosidad) y los niveles de hierro y eritropoyetina, además del linaje en el cual ocurre el evento (Abdulaali, 2009).

Todos los síntomas patológicos observados en los animales trasplantados son los típicamente descritos en neoplasias hematológicas: pérdida de peso, ataxia, esplenomegalia, alta susceptibilidad a infecciones y dificultad en la cicatrización de heridas. En nuestro modelo una de las características más llamativas fue la esplenomegalia. Relativo a la expresión del transgén en los bazo, los resultados de los ensayos de inmunofluorescencia muestran que BCR-JAK2 se expresa *in vivo*. También hemos observado que los animales trasplantados con BCR-JAK2 tardan más en cicatrizar las heridas provocadas por las marcas de identidad en las orejas y las

punciones para extracción de sangre en la vena caudal. Sin embargo, no hemos podido confirmar ninguna correlación con una depleción de los contajes de plaquetas. Tampoco hemos observado infiltración de órganos no hematopoyéticos como pulmón, hígado, nódulos linfáticos y timo, si bien sí han sido descritas en otros modelos como el ratón transgénico de TEL-JAK2 (Carron et al., 2000) y un modelo *in vivo* de sobreexpresión de Stat5 (Lin et al., 2013).

Las extensiones de sangre periférica de los animales trasplantados teñidas con hematoxilina/eosina mostraron la presencia de células inmaduras y precursores de las líneas mieloide y eritroide: mieloblastos, mielocitos basófilos y megacariocitos. Además, hemos detectado defectos en la eritropoyesis tales como anisocitosis, acantocitos y cuerpos de Howell-Jolly, que sugieren un bloqueo en la maduración de la serie roja. Este punto resulta interesante ya que hay estudios que afirman que la mutación JAK2^{V617F} presente en pacientes con PV compromete a la célula madre hematopoyética al linaje eritroide en la diferenciación (Jamieson et al., 2006). Por otra parte, TEL-JAK2 también ha sido implicada en procesos de proliferación y diferenciación eritroide en ausencia de EPO en un modelo *in vivo* con animales inmunodeficientes (Kennedy et al., 2006).

Uno de los resultados más informativos que hemos obtenido son los marcajes en médula ósea para caracterizar las poblaciones más inmaduras. El inmunofenotipo de poblaciones inmaduras realizado con los marcadores Lin, Sca-1, c-Kit, FcγR y CD34 nos muestra que aunque los progenitores de los animales trasplantados a 30 dpt muestran un aumento del PMC a expensas del PGM, que probablemente son responsables del incremento de células maduras a 60 dpt. Varios estudios han reportado desajustes en estas poblaciones de progenitores comprometidos en el contexto de pacientes con LMC BCR-ABL⁺ (Koschmieder et al., 2005, Diaz-Blanco et al., 2007). Es interesante señalar que también se ha descrito cómo una forma hiperactiva de STAT5 desencadena *in vivo* una granulopoyesis aberrante y agresiva con extravasación letal, principalmente en los pulmones, así como drásticas disminuciones de los progenitores PCM y MEP (Lin et al., 2013). Por otro lado, se considera que STAT5 juega un papel fundamental a la hora de mantener un equilibrio en el destino mieloide o linfoide de los progenitores (Kieslinger et al., 2000, Li et al., 2007a, Fievez et al., 2007, Kimura et al., 2009), de manera que parece sensato pensar que en nuestro modelo la activación constitutiva de STAT5 mediada por BCR-JAK2 es la responsable de estos desarreglos en las poblaciones más inmaduras. Sin embargo, en nuestro modelo la población más aumentada son células mieloides que expresan Gr-1⁺ Mac-1⁺ y por tanto, maduras. En este sentido cabe destacar que cuando hemos realizado trasplantes secundarios no hemos conseguido apenas injerto de los progenitores de médula ósea, lo que apoya la idea de que el fenotipo de éstas células es maduro, y por tanto la enfermedad provocada se asemejaría a una LMC en fase crónica.

Otra de las observaciones más llamativas que se desprenden de los ensayos de inmunofenotipo de las muestras de tejidos hematopoyéticos es que mientras los animales del grupo control mostraban células EGFP⁺ en porcentajes variables, no hemos podido confirmar la expresión del

gen marcador por citometría de flujo en los animales del grupo BCR-JAK2. Esta observación en el contexto de un fenotipo tan claro como el que se describe nos hizo valorar la posibilidad de que la secuencia reguladora del transgén pudiera ser transcripcionalmente menos activa debido a mecanismos epigenéticos como la metilación de islas CpG (Deaton and Bird, 2011). Este extremo quedó confirmado con un estudio celular *in vitro* y otro molecular, que confirman que la secuencia reguladora U3, que dirige la expresión del transgén en las muestras biológicas, está altamente metilada. En concordancia con estos resultados existen varias publicaciones donde se describe la inactivación transcripcional de la LTR retroviral derivada del virus de leucemia de ratón Moloney, clonada en el vector pLZR-IRES-EGFP (Bednarik et al., 1990, Kauder et al., 2009).

Por otra parte, dado que la construcción retroviral empleada posee una secuencia IRES entre el ADNc de BCR-JAK2 y el de la EGFP, las diferencias en los niveles de expresión entre los dos grupos de animales trasplantados podrían asignarse al hecho de que la expresión de los genes que están más próximos a la secuencia reguladora es mayor que la de los que están después del IRES. Apoyando esta tesis hay trabajos que describen cómo los genes que van en segundo lugar en una construcción bicistónica separada por un IRES pueden ver reducida su expresión hasta un 50% en comparación con el primero (Zhou et al., 1998, Mizuguchi et al., 2000). Así, aunque en nuestro modelo advertimos un fenotipo muy claro causado por BCR-JAK2, esta proteína se expresaría a niveles muy bajos debido a la metilación de la secuencia U3, y la EGFP ni siquiera podría detectarse porque se encuentra clonada después del IRES.

Ante la imposibilidad de recurrir a la expresión de EGFP como gen marcador confirmamos la expresión de BCR-JAK2 en los tejidos de los animales trasplantados por PCR a tiempo real. Este ensayo nos permitió correlacionar el fenotipo con la expresión de BCR-JAK2 en muestras de médula ósea: todos los animales que mostraron expresión de BCR-JAK2 por qPCR desarrollaron la enfermedad. Además analizamos a nivel genómico la integración de copias del vector y confirmamos que ambos grupos de trasplante tenían números de copias similares. Estos datos en conjunto vendrían a confirmar que la expresión de BCR-JAK2 es suficiente para desencadenar un síndrome mieloproliferativo fatal.

Es de vital importancia a la hora de analizar estos resultados tener en cuenta que los γ -retrovirus (familia a la cual pertenece el plásmido pLZR-IRES-EGFP empleado en este trabajo) tienen la capacidad de insertar su genoma en el ADN del huésped y que esta integración no es sencillamente al azar sino que existen determinadas regiones del genoma donde se acumulan preferentemente. Se ha descrito que los sitios de integración pueden ser regiones promotoras de genes transcripcionalmente activos (Coffin et al., 1997, Bushman, 2003, Cavazza et al., 2013) y en algunos casos puede ocurrir en promotores de genes activos e inducir la expresión de proto-oncogenes o genes relacionados con la proliferación. Este fenómeno se conoce como mutagénesis insercional y también se ha observado en modelos *in vivo* (Li et al., 2002). En este trabajo no hemos realizado ningún ensayo (LAM-PCR) para determinar los sitios de integración en nuestro sistema y así excluir que los fenotipos observados tengan relación con este fenómeno. Sin

embargo, hay datos que nos llevan a descartar este extremo: ninguno de los animales de los grupos control, transducidos con la misma construcción retroviral a excepción del transgén BCR-JAK2, ha mostrado ningún signo de enfermedad. Además, se realizaron tres experimentos independientes que harían esperar integraciones en distintas regiones y por tanto efectos distintos.

Con objeto de descartar cualquier tipo de inserción aberrante clonamos el ADNc de BCR-JAK2 en el vector lentiviral pRRL-IRES-EGFP (Dull et al., 1998). La capacidad de los lentivirus para integrarse cerca de secuencias reguladoras de genes transcripcionalmente activos es mucho menor y por tanto son más adecuados desde el punto de vista de bioseguridad (Biffi et al., 2011, Montini et al., 2006). Sin embargo, la producción de sobrenadantes lentivirales rindió títulos muy bajos ya que las células de la línea productora de partículas retrovirales con BCR-JAK2 morían a las pocas horas de la transfección. Esto nos lleva a proponer que este vector, cuya expresión está dirigida por el promotor del citomegalovirus humano (CMV), proporciona altos niveles de expresión de BCR-JAK2 que pueden llegar a resultar perjudiciales a altas concentraciones, como ya se ha descrito para el ligando de Fas y TNF- α humano, cuyos altos niveles de expresión resultan tóxicos para las células (Rubinchik et al., 2000, Hu et al., 1997). De esta forma, el modelo retroviral en nuestras manos muestra una expresión baja pero relativamente “fisiológica” que permite evaluar funcionalmente BCR-JAK2 sin que esta sea perjudicial para la célula.

Todo este conjunto de datos nos lleva a proponer que BCR-JAK2 tiene propiedades oncogénicas probadas tanto *in vitro* como *in vivo*, y aunque es el resultado de una traslocación muy poco conocida, sería interesante comprobar su posible presencia en pacientes con leucemias no asociadas a marcadores como el Ph'. Por tanto, proponemos que debe ser tomada en cuenta en el contexto de las mutaciones y reordenamientos de JAK2 que son clave en el desarrollo de síndromes mieloproliferativos y leucemias.

CONCLUSIONES

- 1.- El gen de fusión *BCR-JAK2* da lugar a una proteína quimérica constituida por el dominio de oligomerización de BCR y el dominio quinasa de JAK2.
- 2.- BCR-JAK2 se localiza en el citoplasma y presenta actividad tirosín-quinasa constitutiva.
- 3.- La expresión de BCR-JAK2 en la línea celular de ratón dependiente de IL-3 Ba/F3 confiere a estas células la capacidad de proliferar en ausencia de este factor de crecimiento.
- 4.- STAT5 es una molécula efectora en la vía de JAK/STAT y se encuentra hiperfosforilada en presencia de BCR-JAK2, lo que sugiere una activación desregulada de esta ruta de señalización.
- 5.- *Bcl-xL*, *Osm* y *Socs2*, genes diana de STAT5, se expresan en ausencia de IL-3, debido a la actividad de BCR-JAK2, lo que conduce a la supervivencia y proliferación de estas células.
- 6.- El inhibidor selectivo de JAK2, TG101209 es capaz de impedir *in vitro* la fosforilación de BCR-JAK2 así como de la proteína JAK2 endógena en el modelo creado en la línea celular de ratón Ba/F3, produciendo la apoptosis únicamente de las células que expresan la fusión BCR-JAK2.
- 7.- Las células Ba/F3 que expresan BCR-JAK2 son capaces de proliferar y crear tumores subcutáneos en un modelo de ratón inmunodeficiente.
- 8.- La expresión de BCR-JAK2 en el compartimento hematopoyético conlleva el desarrollo de un síndrome mieloproliferativo fatal con un período de latencia de 25 a 190 días y con una tasa de supervivencia del 48%. También provoca síntomas típicos como son altos contajes leucocitarios y presencia de progenitores inmaduros en sangre periférica, así como esplenomegalia y desajustes en los distintos linajes de sangre periférica y de progenitores de médula ósea.

BIBLIOGRAFÍA

- ABAD, J. L., SERRANO, F., SAN ROMAN, A. L., DELGADO, R., BERNAD, A. & GONZALEZ, M. A. 2002. Single-step, multiple retroviral transduction of human T cells. *J Gene Med*, 4, 27-37.
- ADAMS, J. M., HOUSTON, H., ALLEN, J., LINTS, T. & HARVEY, R. 1992. The hematopoietically expressed vav proto-oncogene shares homology with the dbl GDP-GTP exchange factor, the bcr gene and a yeast gene (CDC24) involved in cytoskeletal organization. *Oncogene*, 7, 611-8.
- ADOLFSSON, J., BORGE, O. J., BRYDER, D., THEILGAARD-MONCH, K., ASTRAND-GRUNDSTROM, I., SITNICKA, E., SASAKI, Y. & JACOBSEN, S. E. 2001. Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity*, 15, 659-69.
- AKASHI, K., TRAVER, D., MIYAMOTO, T. & WEISSMAN, I. L. 2000. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*, 404, 193-7.
- AKIRA, S. 1999. Functional roles of STAT family proteins: lessons from knockout mice. *Stem Cells*, 17, 138-46.
- ALABDULAALI, M. 2009. The role of JAK2 abnormalities in hematologic malignancies. *Hemat. Rev.*, 1, 56-61.
- AMARANTE-MENDES, G. P., MCGAHON, A. J., NISHIOKA, W. K., AFAR, D. E., WITTE, O. N. & GREEN, D. R. 1998. Bcl-2-independent Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis: protection is correlated with up regulation of Bcl-xL. *Oncogene*, 16, 1383-90.
- ARAVIND, L. & KOONIN, E. V. 2000. SAP - a putative DNA-binding motif involved in chromosomal organization. *Trends Biochem Sci*, 25, 112-4.
- ARGETSINGER, L. S., STUCKEY, J. A., ROBERTSON, S. A., KOLEVA, R. I., CLINE, J. M., MARTO, J. A., MYERS, M. G., JR. & CARTER-SU, C. 2010. Tyrosines 868, 966, and 972 in the kinase domain of JAK2 are autophosphorylated and required for maximal JAK2 kinase activity. *Mol Endocrinol*, 24, 1062-76.
- ARONICA, M. G., BRIZZI, M. F., DENTELLI, P., ROSSO, A., YARDEN, Y. & PEGORARO, L. 1996. p91 STAT1 activation in interleukin-3-stimulated primary acute myeloid leukemia cells. *Oncogene*, 13, 1017-26.
- BAERSCH, G., MOLLERS, T., HOTTE, A., DOCKHORN-DWORNICZAK, B., RUBE, C., RITTER, J., JURGENS, H. & VORMOOR, J. 1997. Good engraftment of B-cell precursor ALL in NOD-SCID mice. *Klin Padiatr*, 209, 178-85.
- BAFFERT, F., REGNIER, C. H., DE POVER, A., PISSOT-SOLDERMANN, C., TAVARES, G. A., BLASCO, F., BRUEGGEN, J., CHENE, P., DRUECKES, P., ERDMANN, D., FURET, P., GERSPACHER, M., LANG, M., LEDIEU, D., NOLAN, L., RUETZ, S., TRAPPE, J., VANGREVELINGHE, E., WARTMANN, M., WYDER, L., HOFMANN, F. & RADIMERSKI, T. 2010. Potent and selective inhibition of polycythemia by the quinoxaline JAK2 inhibitor NVP-BSK805. *Mol Cancer Ther*, 9, 1945-55.
- BALLEN, K. K., VALINSKI, H., GREINER, D., SHULTZ, L. D., BECKER, P. S., HSIEH, C. C., STEWART, F. M. & QUESENBERRY, P. J. 2001. Variables to predict engraftment of umbilical cord blood into immunodeficient mice: usefulness of the non-obese diabetic-severe combined immunodeficient assay. *Br J Haematol*, 114, 211-8.

- BASHAM, B., SATHE, M., GREIN, J., MCCLANAHAN, T., D'ANDREA, A., LEES, E. & RASCLE, A. 2008. In vivo identification of novel STAT5 target genes. *Nucleic Acids Res*, 36, 3802-18.
- BAXTER, E. J., HOCHHAUS, A., BOLUFER, P., REITER, A., FERNANDEZ, J. M., SENENT, L., CERVERA, J., MOSCARDO, F., SANZ, M. A. & CROSS, N. C. 2002. The t(4;22)(q12;q11) in atypical chronic myeloid leukaemia fuses BCR to PDGFRA. *Hum Mol Genet*, 11, 1391-7.
- BAXTER, E. J., SCOTT, L. M., CAMPBELL, P. J., EAST, C., FOUROUCLAS, N., SWANTON, S., VASSILIOU, G. S., BENCH, A. J., BOYD, E. M., CURTIN, N., SCOTT, M. A., ERBER, W. N., GREEN, A. R. & CANCER GENOME, P. 2005. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*, 365, 1054-61.
- BAZZONI, G., CARLESSO, N., GRIFFIN, J. D. & HEMLER, M. E. 1996. Bcr/Abl expression stimulates integrin function in hematopoietic cell lines. *J Clin Invest*, 98, 521-8.
- BEDNARIK, D. P., COOK, J. A. & PITHA, P. M. 1990. Inactivation of the HIV LTR by DNA CpG methylation: evidence for a role in latency. *EMBO J*, 9, 1157-64.
- BELLESO, M., SANTUCCI, R., DIAS, D. F., CENTRONE, R. & ELIAS, R. C. 2013. Atypical chronic myeloid leukemia with t(9;22)(p24,11.2), a BCR-JAK2 fusion gene. *Rev Bras Hematol Hemoter*, 35, 218-9.
- BENEKLI, M., BAER, M. R., BAUMANN, H. & WETZLER, M. 2003. Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemias. *Blood*, 101, 2940-54.
- BHATIA, R., MCCARTHY, J. B. & VERFAILLIE, C. M. 1996. Interferon-alpha restores normal beta 1 integrin-mediated inhibition of hematopoietic progenitor proliferation by the marrow microenvironment in chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 87, 3883-91.
- BIFFI, A., BARTOLOMAE, C. C., CESANA, D., CARTIER, N., AUBOURG, P., RANZANI, M., CESANI, M., BENEDICENTI, F., PLATI, T., RUBAGOTTI, E., MERELLA, S., CAPOTONDO, A., SGUALDINO, J., ZANETTI, G., VON KALLE, C., SCHMIDT, M., NALDINI, L. & MONTINI, E. 2011. Lentiviral vector common integration sites in preclinical models and a clinical trial reflect a benign integration bias and not oncogenic selection. *Blood*, 117, 5332-9.
- BLANK, U., KARLSSON, G. & KARLSSON, S. 2008. Signaling pathways governing stem-cell fate. *Blood*, 111, 492-503.
- BLUME-JENSEN, P. & HUNTER, T. 2001. Oncogenic kinase signalling. *Nature*, 411, 355-65.
- BLUYSSSEN, H. A. & LEVY, D. E. 1997. Stat2 is a transcriptional activator that requires sequence-specific contacts provided by stat1 and p48 for stable interaction with DNA. *J Biol Chem*, 272, 4600-5.
- BOSMA, G. C., CUSTER, R. P. & BOSMA, M. J. 1983. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature*, 301, 527-30.
- BOUSQUET, M., QUELEN, C., DE MAS, V., DUCHAYNE, E., ROQUEFEUIL, B., DELSOL, G., LAURENT, G., DASTUGUE, N. & BROUSSET, P. 2005. The t(8;9)(p22;p24) translocation in atypical chronic myeloid leukaemia yields a new PCM1-JAK2 fusion gene. *Oncogene*, 24, 7248-52.
- BROMBERG, J. F., WRZESZCZYNSKA, M. H., DEVGAN, G., ZHAO, Y., PESTELL, R. G., ALBANESE, C. & DARNELL, J. E., JR. 1999. Stat3 as an oncogene. *Cell*, 98, 295-303.

- BROOME, H. E., DARGAN, C. M., KRAJEWSKI, S. & REED, J. C. 1995. Expression of Bcl-2, Bcl-x, and Bax after T cell activation and IL-2 withdrawal. *J Immunol*, 155, 2311-7.
- BUCHDUNGER, E., CIOFFI, C. L., LAW, N., STOVER, D., OHNO-JONES, S., DRUKER, B. J. & LYDON, N. B. 2000. Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, 295, 139-45.
- BUETTNER, R., MORA, L. B. & JOVE, R. 2002. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin Cancer Res*, 8, 945-54.
- BUMM, T. G., ELSEA, C., CORBIN, A. S., LORIAUX, M., SHERBENOU, D., WOOD, L., DEININGER, J., SILVER, R. T., DRUKER, B. J. & DEININGER, M. W. 2006. Characterization of murine JAK2V617F-positive myeloproliferative disease. *Cancer Res*, 66, 11156-65.
- BURMESTER, G. R., BLANCO, R., CHARLES-SCHOEMAN, C., WOLLENHAUPT, J., ZERBINI, C., BENDA, B., GRUBEN, D., WALLENSTEIN, G., KRISHNASWAMI, S., ZWILLICH, S. H., KONCZ, T., SOMA, K., BRADLEY, J., MEBUS, C. & INVESTIGATORS, O. S. 2013. Tofacitinib (CP-690,550) in combination with methotrexate in patients with active rheumatoid arthritis with an inadequate response to tumour necrosis factor inhibitors: a randomised phase 3 trial. *Lancet*, 381, 451-60.
- BUSHMAN, F. D. 2003. Targeting survival: integration site selection by retroviruses and LTR-retrotransposons. *Cell*, 115, 135-8.
- CAMPBELL, M. L., LI, W. & ARLINGHAUS, R. B. 1990. P210 BCR-ABL is complexed to P160 BCR and ph-P53 proteins in K562 cells. *Oncogene*, 5, 773-6.
- CARRON, C., CORMIER, F., JANIN, A., LACRONIQUE, V., GIOVANNINI, M., DANIEL, M. T., BERNARD, O. & GHYSDAEL, J. 2000. TEL-JAK2 transgenic mice develop T-cell leukemia. *Blood*, 95, 3891-9.
- CATLETT-FALCONE, R., LANDOWSKI, T. H., OSHIRO, M. M., TURKSON, J., LEVITZKI, A., SAVINO, R., CILIBERTO, G., MOSCINSKI, L., FERNANDEZ-LUNA, J. L., NUNEZ, G., DALTON, W. S. & JOVE, R. 1999. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity*, 10, 105-15.
- CAVAZZA, A., MOIANI, A. & MAVILIO, F. 2013. Mechanisms of retroviral integration and mutagenesis. *Hum Gene Ther*, 24, 119-31.
- CHANGELIAN, P. S., FLANAGAN, M. E., BALL, D. J., KENT, C. R., MAGNUSON, K. S., MARTIN, W. H., RIZZUTI, B. J., SAWYER, P. S., PERRY, B. D., BRISSETTE, W. H., MCCURDY, S. P., KUDLACZ, E. M., CONKLYN, M. J., ELLIOTT, E. A., KOSLOV, E. R., FISHER, M. B., STRELEVITZ, T. J., YOON, K., WHIPPLE, D. A., SUN, J., MUNCHHOF, M. J., DOTY, J. L., CASAVANT, J. M., BLUMENKOPF, T. A., HINES, M., BROWN, M. F., LILLIE, B. M., SUBRAMANYAM, C., SHANGPOA, C., MILICI, A. J., BECKIUS, G. E., MOYER, J. D., SU, C., WOODWORTH, T. G., GAWECO, A. S., BEALS, C. R., LITTMAN, B. H., FISHER, D. A., SMITH, J. F., ZAGOURAS, P., MAGNA, H. A., SALTARELLI, M. J., JOHNSON, K. S., NELMS, L. F., DES ETAGES, S. G., HAYES, L. S., KAWABATA, T. T., FINCO-KENT, D., BAKER, D. L., LARSON, M., SI, M. S., PANIAGUA, R., HIGGINS, J., HOLM, B., REITZ, B., ZHOU, Y. J., MORRIS, R. E., O'SHEA, J. J. & BORIE, D. C. 2003. Prevention of organ allograft rejection by a specific Janus kinase 3 inhibitor. *Science*, 302, 875-8.

- CHAPMAN, R. S., LOURENCO, P. C., TONNER, E., FLINT, D. J., SELBERT, S., TAKEDA, K., AKIRA, S., CLARKE, A. R. & WATSON, C. J. 1999. Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of Stat3. *Genes Dev*, 13, 2604-16.
- CHARRIER, S., FERRAND, M., ZERBATO, M., PRECIGOUT, G., VIORNERY, A., BUCHER-LAURENT, S., BENKHELIFA-ZIYYAT, S., MERTEN, O. W., PEREA, J. & GALY, A. 2011. Quantification of lentiviral vector copy numbers in individual hematopoietic colony-forming cells shows vector dose-dependent effects on the frequency and level of transduction. *Gene Ther*, 18, 479-87.
- CHEN, E., STAUDT, L. M. & GREEN, A. R. 2012. Janus kinase deregulation in leukemia and lymphoma. *Immunity*, 36, 529-41.
- CHEN, M., CHENG, A., CANDOTTI, F., ZHOU, Y. J., HYMEL, A., FASTH, A., NOTARANGELO, L. D. & O'SHEA, J. J. 2000. Complex effects of naturally occurring mutations in the JAK3 pseudokinase domain: evidence for interactions between the kinase and pseudokinase domains. *Mol Cell Biol*, 20, 947-56.
- CHEN, X., VINKEMEIER, U., ZHAO, Y., JERUZALMI, D., DARNELL, J. E., JR. & KURIYAN, J. 1998. Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell*, 93, 827-39.
- CIRMENA, G., ALIANO, S., FUGAZZA, G., BRUZZONE, R., GARUTI, A., BOCCIARDI, R., BACIGALUPO, A., RAVAZZOLO, R., BALLESTRERO, A. & SESSAREGO, M. 2008. A BCR-JAK2 fusion gene as the result of a t(9;22)(p24;q11) in a patient with acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, 183, 105-8.
- COFFIN, J. M., HUGHES, S. H. & VARMUS, H. E. 1997. The Interactions of Retroviruses and their Hosts.
- CUESTA-DOMINGUEZ, A., ORTEGA, M., ORMAZABAL, C., SANTOS-RONCERO, M., GALAN-DIEZ, M., STEEGMANN, J. L., FIGUERA, A., ARRANZ, E., VIZMANOS, J. L., BUEREN, J. A., RIO, P. & FERNANDEZ-RUIZ, E. 2012. Transforming and tumorigenic activity of JAK2 by fusion to BCR: molecular mechanisms of action of a novel BCR-JAK2 tyrosine-kinase. *PLoS One*, 7, e32451.
- DALEY, G. Q., VAN ETEN, R. A. & BALTIMORE, D. 1990. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science*, 247, 824-30.
- DALEY, G. Q., VAN ETEN, R. A. & BALTIMORE, D. 1991. Blast crisis in a murine model of chronic myelogenous leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 11335-8.
- DANIAL, N. N., LOSMAN, J. A., LU, T., YIP, N., KRISHNAN, K., KROLEWSKI, J., GOFF, S. P., WANG, J. Y. & ROTHMAN, P. B. 1998. Direct interaction of Jak1 and v-Abl is required for v-Abl-induced activation of STATs and proliferation. *Mol Cell Biol*, 18, 6795-804.
- DANIAL, N. N., PERNIS, A. & ROTHMAN, P. B. 1995. Jak-STAT signaling induced by the v-abl oncogene. *Science*, 269, 1875-7.
- DARNELL, J. E., JR., KERR, I. M. & STARK, G. R. 1994. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*, 264, 1415-21.
- DASH, A. B., WILLIAMS, I. R., KUTOK, J. L., TOMASSON, M. H., ANASTASIADOU, E., LINDAHL, K., LI, S., VAN ETEN, R. A., BORROW, J., HOUSMAN, D., DRUKER, B. & GILLILAND, D. G. 2002. A murine model of CML blast crisis

- induced by cooperation between BCR/ABL and NUP98/HOXA9. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 7622-7.
- DAVID, M., CHEN, H. E., GOELZ, S., LARNER, A. C. & NEEL, B. G. 1995a. Differential regulation of the alpha/beta interferon-stimulated Jak/Stat pathway by the SH2 domain-containing tyrosine phosphatase SHPTP1. *Mol Cell Biol*, 15, 7050-8.
- DAVID, M., PETRICIOIN, E., 3RD, BENJAMIN, C., PINE, R., WEBER, M. J. & LARNER, A. C. 1995b. Requirement for MAP kinase (ERK2) activity in interferon alpha- and interferon beta-stimulated gene expression through STAT proteins. *Science*, 269, 1721-3.
- DAWSON, M. A., BANNISTER, A. J., GOTTGENS, B., FOSTER, S. D., BARTKE, T., GREEN, A. R. & KOUZARIDES, T. 2009. JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1alpha from chromatin. *Nature*, 461, 819-22.
- DE GROOT, R. P., RAAIJMAKERS, J. A., LAMMERS, J. W., JOVE, R. & KOENDERMAN, L. 1999. STAT5 activation by BCR-Abl contributes to transformation of K562 leukemia cells. *Blood*, 94, 1108-12.
- DE GROOT, R. P., RAAIJMAKERS, J. A., LAMMERS, J. W. & KOENDERMAN, L. 2000. STAT5-Dependent CyclinD1 and Bcl-xL expression in Bcr-Abl-transformed cells. *Mol Cell Biol Res Commun*, 3, 299-305.
- DEATON, A. M. & BIRD, A. 2011. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev*, 25, 1010-22.
- DEMIROGLU, A., STEER, E. J., HEATH, C., TAYLOR, K., BENTLEY, M., ALLEN, S. L., KODURU, P., BRODY, J. P., HAWSON, G., RODWELL, R., DOODY, M. L., CARNICERO, F., REITER, A., GOLDMAN, J. M., MELO, J. V. & CROSS, N. C. 2001. The t(8;22) in chronic myeloid leukemia fuses BCR to FGFR1: transforming activity and specific inhibition of FGFR1 fusion proteins. *Blood*, 98, 3778-83.
- DIAZ-BLANCO, E., BRUNS, I., NEUMANN, F., FISCHER, J. C., GRAEF, T., ROSSKOPF, M., BRORS, B., PECHTEL, S., BORK, S., KOCH, A., BAER, A., ROHR, U. P., KOBBE, G., VON HAESELER, A., GATTERMANN, N., HAAS, R. & KRONENWETT, R. 2007. Molecular signature of CD34(+) hematopoietic stem and progenitor cells of patients with CML in chronic phase. *Leukemia*, 21, 494-504.
- DIEKMANN, D., BRILL, S., GARRETT, M. D., TOTTY, N., HSUAN, J., MONFRIES, C., HALL, C., LIM, L. & HALL, A. 1991. Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21rac. *Nature*, 351, 400-2.
- DOS SANTOS, N. R. & GHYSDAEL, J. 2006. A transgenic mouse model for TEL-JAK2-induced B-cell lymphoma/leukemia. *Leukemia*, 20, 182-5.
- DRUKER, B. J., GUILHOT, F., O'BRIEN, S. G., GATHMANN, I., KANTARJIAN, H., GATTERMANN, N., DEININGER, M. W., SILVER, R. T., GOLDMAN, J. M., STONE, R. M., CERVANTES, F., HOCHHAUS, A., POWELL, B. L., GABRILOVE, J. L., ROUSSELOT, P., REIFFERS, J., CORNELISSEN, J. J., HUGHES, T., AGIS, H., FISCHER, T., VERHOEF, G., SHEPHERD, J., SAGLIO, G., GRATWOHL, A., NIELSEN, J. L., RADICH, J. P., SIMONSSON, B., TAYLOR, K., BACCARANI, M., SO, C., LETVAK, L., LARSON, R. A. & INVESTIGATORS, I. 2006. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 355, 2408-17.

- DRUKER, B. J. & LYDON, N. B. 2000. Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *J Clin Invest*, 105, 3-7.
- DRUKER, B. J., TAMURA, S., BUCHDUNGER, E., OHNO, S., SEGAL, G. M., FANNING, S., ZIMMERMANN, J. & LYDON, N. B. 1996. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med*, 2, 561-6.
- DULL, T., ZUFFEREY, R., KELLY, M., MANDEL, R. J., NGUYEN, M., TRONO, D. & NALDINI, L. 1998. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol*, 72, 8463-71.
- DUNCAN, S. A., ZHONG, Z., WEN, Z. & DARNELL, J. E., JR. 1997. STAT signaling is active during early mammalian development. *Dev Dyn*, 208, 190-8.
- ELNAGGAR, M. M., AGERSBORG, S., SAHOO, T., GIRGIN, A., MA, W., RAKKHIT, R., ZORRILLA, I. & LEAL, A. 2012. BCR-JAK2 fusion as a result of a translocation (9;22)(p24;q11.2) in a patient with CML-like myeloproliferative disease. *Mol Cytogenet*, 5, 23.
- ENDO, T. A., MASUHARA, M., YOKOUCHI, M., SUZUKI, R., SAKAMOTO, H., MITSUI, K., MATSUMOTO, A., TANIMURA, S., OHTSUBO, M., MISAWA, H., MIYAZAKI, T., LEONOR, N., TANIGUCHI, T., FUJITA, T., KANAKURA, Y., KOMIYA, S. & YOSHIMURA, A. 1997. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature*, 387, 921-4.
- FADERL, S., KANTARJIAN, H. M., THOMAS, D. A., CORTES, J., GILES, F., PIERCE, S., ALBITAR, M. & ESTROV, Z. 2000. Outcome of Philadelphia chromosome-positive adult acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*, 36, 263-73.
- FEENER, E. P., ROSARIO, F., DUNN, S. L., STANCHEVA, Z. & MYERS, M. G., JR. 2004. Tyrosine phosphorylation of Jak2 in the JH2 domain inhibits cytokine signaling. *Mol Cell Biol*, 24, 4968-78.
- FENG, J., WITTHUHN, B. A., MATSUDA, T., KOHLHUBER, F., KERR, I. M. & IHLE, J. N. 1997. Activation of Jak2 catalytic activity requires phosphorylation of Y1007 in the kinase activation loop. *Mol Cell Biol*, 17, 2497-501.
- FIEVEZ, L., DESMET, C., HENRY, E., PAJAK, B., HEGENBARTH, S., GARZE, V., BEX, F., JASPAR, F., BOUTET, P., GILLET, L., VANDERPLASSCHEN, A., KNOLLE, P. A., LEO, O., MOSER, M., LEKEUX, P. & BUREAU, F. 2007. STAT5 is an ambivalent regulator of neutrophil homeostasis. *PLoS One*, 2, e727.
- FILIPPAKOPOULOS, P., KOFLER, M., HANTSCH, O., GISH, G. D., GREBIEN, F., SALAH, E., NEUDECKER, P., KAY, L. E., TURK, B. E., SUPERTI-FURGA, G., PAWSON, T. & KNAPP, S. 2008. Structural coupling of SH2-kinase domains links Fes and Abl substrate recognition and kinase activation. *Cell*, 134, 793-803.
- FRIDMAN, J. S., SCHERLE, P. A., COLLINS, R., BURN, T. C., LI, Y., LI, J., COVINGTON, M. B., THOMAS, B., COLLIER, P., FAVATA, M. F., WEN, X., SHI, J., MCGEE, R., HALEY, P. J., SHEPARD, S., RODGERS, J. D., YELESWARAM, S., HOLLIS, G., NEWTON, R. C., METCALF, B., FRIEDMAN, S. M. & VADDI, K. 2010. Selective inhibition of JAK1 and JAK2 is efficacious in rodent models of arthritis: preclinical characterization of INCB028050. *J Immunol*, 184, 5298-307.
- GEEST, C. R. & COFFER, P. J. 2009. MAPK signaling pathways in the regulation of hematopoiesis. *J Leukoc Biol*, 86, 237-50.

- GHORESCHI, K., MROWIETZ, U. & ROCKEN, M. 2003. A molecule solves psoriasis? Systemic therapies for psoriasis inducing interleukin 4 and Th2 responses. *J Mol Med (Berl)*, 81, 471-80.
- GOFFIN, V., BERNICHTEIN, S., TOURAINE, P. & KELLY, P. A. 2005. Development and potential clinical uses of human prolactin receptor antagonists. *Endocr Rev*, 26, 400-22.
- GOLUB, T. R., GOGA, A., BARKER, G. F., AFAR, D. E., MCLAUGHLIN, J., BOHLANDER, S. K., ROWLEY, J. D., WITTE, O. N. & GILLILAND, D. G. 1996. Oligomerization of the ABL tyrosine kinase by the Ets protein TEL in human leukemia. *Mol Cell Biol*, 16, 4107-16.
- GORDON, M. Y., DOWDING, C. R., RILEY, G. P., GOLDMAN, J. M. & GREAVES, M. F. 1987. Altered adhesive interactions with marrow stroma of haematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature*, 328, 342-4.
- GRANDIS, J. R., DRENNING, S. D., ZENG, Q., WATKINS, S. C., MELHEM, M. F., ENDO, S., JOHNSON, D. E., HUANG, L., HE, Y. & KIM, J. D. 2000. Constitutive activation of Stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 4227-32.
- GREBIEN, F., HANTSCH, O., WOJCIK, J., KAUPPE, I., KOVACIC, B., WYRZUCKI, A. M., GISH, G. D., CERNY-REITERER, S., KOIDE, A., BEUG, H., PAWSON, T., VALENT, P., KOIDE, S. & SUPERTI-FURGA, G. 2011. Targeting the SH2-kinase interface in Bcr-Abl inhibits leukemogenesis. *Cell*, 147, 306-19.
- GREENHALGH, C. J., BERTOLINO, P., ASA, S. L., METCALF, D., CORBIN, J. E., ADAMS, T. E., DAVEY, H. W., NICOLA, N. A., HILTON, D. J. & ALEXANDER, W. S. 2002. Growth enhancement in suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS-2)-deficient mice is dependent on signal transducer and activator of transcription 5b (STAT5b). *Mol Endocrinol*, 16, 1394-406.
- GREENHALGH, C. J. & HILTON, D. J. 2001. Negative regulation of cytokine signaling. *J Leukoc Biol*, 70, 348-56.
- GRIESINGER, F., HENNIG, H., HILLMER, F., PODLESCHNY, M., STEFFENS, R., PIES, A., WORMANN, B., HAASE, D. & BOHLANDER, S. K. 2005. A BCR-JAK2 fusion gene as the result of a t(9;22)(p24;q11.2) translocation in a patient with a clinically typical chronic myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*, 44, 329-33.
- GUO, X. Y., CUILLEROT, J. M., WANG, T., WU, Y., ARLINGHAUS, R., CLAXTON, D., BACHIER, C., GREENBERGER, J., COLOMBOWALA, I. & DEISSEROTH, A. B. 1998. Peptide containing the BCR oligomerization domain (AA 1-160) reverses the transformed phenotype of p210bcr-abl positive 32D myeloid leukemia cells. *Oncogene*, 17, 825-33.
- HANENBERG, H., XIAO, X. L., DILLOO, D., HASHINO, K., KATO, I. & WILLIAMS, D. A. 1996. Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells. *Nat Med*, 2, 876-82.
- HEISTERKAMP, N., JENSTER, G., TEN HOEVE, J., ZOVICH, D., PATTENGAL, P. K. & GROFFEN, J. 1990. Acute leukaemia in bcr/abl transgenic mice. *Nature*, 344, 251-3.
- HEISTERKAMP, N., VONCKEN, J. W., SENADHEERA, D., GONZALEZ-GOMEZ, I., REICHERT, A., HAATAJA, L., REINIKAINEN, A., PATTENGAL, P. K. &

- GROFFEN, J. 2000. Reduced oncogenicity of p190 Bcr/Abl F-actin-binding domain mutants. *Blood*, 96, 2226-32.
- HOELBL, A., KOVACIC, B., KERENYI, M. A., SIMMA, O., WARSCH, W., CUI, Y., BEUG, H., HENNIGHAUSEN, L., MORIGGL, R. & SEXL, V. 2006. Clarifying the role of Stat5 in lymphoid development and Abelson-induced transformation. *Blood*, 107, 4898-906.
- HOELBL, A., SCHUSTER, C., KOVACIC, B., ZHU, B., WICKRE, M., HOELZL, M. A., FAJMAN, S., GREBIEN, F., WARSCH, W., STENGL, G., HENNIGHAUSEN, L., POLI, V., BEUG, H., MORIGGL, R. & SEXL, V. 2010. Stat5 is indispensable for the maintenance of bcr/abl-positive leukaemia. *EMBO Mol Med*, 2, 98-110.
- HONDA, H., FUJII, T., TAKATOKU, M., MANO, H., WITTE, O. N., YAZAKI, Y. & HIRAI, H. 1995. Expression of p210bcr/abl by metallothionein promoter induced T-cell leukemia in transgenic mice. *Blood*, 85, 2853-61.
- HORITA, M., ANDREU, E. J., BENITO, A., ARBONA, C., SANZ, C., BENET, I., PROSPER, F. & FERNANDEZ-LUNA, J. L. 2000. Blockade of the Bcr-Abl kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-xL. *J Exp Med*, 191, 977-84.
- HOU, J., SCHINDLER, U., HENZEL, W. J., HO, T. C., BRASSEUR, M. & MCKNIGHT, S. L. 1994. An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat. *Science*, 265, 1701-6.
- HU, S. X., JI, W., ZHOU, Y., LOGOTHETIS, C. & XU, H. J. 1997. Development of an adenovirus vector with tetracycline-regulatable human tumor necrosis factor alpha gene expression. *Cancer Res*, 57, 3339-43.
- HUANG, L. J., CONSTANTINESCU, S. N. & LODISH, H. F. 2001. The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor. *Mol Cell*, 8, 1327-38.
- HUANG, M., DORSEY, J. F., EPLING-BURNETTE, P. K., NIMMANAPALLI, R., LANDOWSKI, T. H., MORA, L. B., NIU, G., SINIBALDI, D., BAI, F., KRAKER, A., YU, H., MOSCINSKI, L., WEI, S., DJEU, J., DALTON, W. S., BHALLA, K., LOUGHRAN, T. P., WU, J. & JOVE, R. 2002a. Inhibition of Bcr-Abl kinase activity by PD180970 blocks constitutive activation of Stat5 and growth of CML cells. *Oncogene*, 21, 8804-16.
- HUANG, Y. H., WU, J. Y., ZHANG, Y. & WU, M. X. 2002b. Synergistic and opposing regulation of the stress-responsive gene IEX-1 by p53, c-Myc, and multiple NF-kappaB/rel complexes. *Oncogene*, 21, 6819-28.
- HUETTNER, C. S., ZHANG, P., VAN ETTEN, R. A. & TENEN, D. G. 2000. Reversibility of acute B-cell leukaemia induced by BCR-ABL1. *Nat Genet*, 24, 57-60.
- HURD, P. J., BANNISTER, A. J., HALLS, K., DAWSON, M. A., VERMEULEN, M., OLSEN, J. V., ISMAIL, H., SOMERS, J., MANN, M., OWEN-HUGHES, T., GOUT, I. & KOUZARIDES, T. 2009. Phosphorylation of histone H3 Thr-45 is linked to apoptosis. *J Biol Chem*, 284, 16575-83.
- IKUTA, K. & WEISSMAN, I. L. 1992. Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 1502-6.
- ILARIA, R. L., JR. & VAN ETTEN, R. A. 1996. P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. *J Biol Chem*, 271, 31704-10.

- IMPERA, L., LONOCE, A., FANFULLA, D. A., MOREILHON, C., LEGROS, L., RAYNAUD, S. & STORLAZZI, C. T. 2011. Two alternatively spliced 5'BCR/3'JAK2 fusion transcripts in a myeloproliferative neoplasm with a three-way t(9;18;22)(p23;p11.3;q11.2) translocation. *Cancer Genet*, 204, 512-5.
- ITO, M., HIRAMATSU, H., KOBAYASHI, K., SUZUE, K., KAWAHATA, M., HIOKI, K., UHEYAMA, Y., KOYANAGI, Y., SUGAMURA, K., TSUJI, K., HEIKE, T. & NAKAHATA, T. 2002. NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood*, 100, 3175-82.
- JAMES, C., UGO, V., CASADEVALL, N., CONSTANTINESCU, S. N. & VAINCHENKER, W. 2005a. A JAK2 mutation in myeloproliferative disorders: pathogenesis and therapeutic and scientific prospects. *Trends Mol Med*, 11, 546-54.
- JAMES, C., UGO, V., LE COUEDIC, J. P., STAERK, J., DELHOMMEAU, F., LACOUT, C., GARCON, L., RASLOVA, H., BERGER, R., BENNACEUR-GRISCELLI, A., VILLEVAL, J. L., CONSTANTINESCU, S. N., CASADEVALL, N. & VAINCHENKER, W. 2005b. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*, 434, 1144-8.
- JAMIESON, C. H., GOTLIB, J., DUROCHER, J. A., CHAO, M. P., MARIAPPAN, M. R., LAY, M., JONES, C., ZEHNDER, J. L., LILLEBERG, S. L. & WEISSMAN, I. L. 2006. The JAK2 V617F mutation occurs in hematopoietic stem cells in polycythemia vera and predisposes toward erythroid differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 6224-9.
- KADEN, B. R., ROSSE, W. F. & HAUCH, T. W. 1979. Immune thrombocytopenia in lymphoproliferative diseases. *Blood*, 53, 545-51.
- KAPLAN, M. H., SUN, Y. L., HOEY, T. & GRUSBY, M. J. 1996. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature*, 382, 174-7.
- KARAGHIOSOFF, M., NEUBAUER, H., LASSNIG, C., KOVARIK, P., SCHINDLER, H., PIRCHER, H., MCCOY, B., BOGDAN, C., DECKER, T., BREM, G., PFEFFER, K. & MULLER, M. 2000. Partial impairment of cytokine responses in Tyk2-deficient mice. *Immunity*, 13, 549-60.
- KAUDER, S. E., BOSQUE, A., LINDQVIST, A., PLANELLES, V. & VERDIN, E. 2009. Epigenetic regulation of HIV-1 latency by cytosine methylation. *PLoS Pathog*, 5, e1000495.
- KELLIHER, M. A., MCLAUGHLIN, J., WITTE, O. N. & ROSENBERG, N. 1990. Induction of a chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with v-abl and BCR/ABL. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 6649-53.
- KENNEDY, J. A., BARABE, F., PATTERSON, B. J., BAYANI, J., SQUIRE, J. A., BARBER, D. L. & DICK, J. E. 2006. Expression of TEL-JAK2 in primary human hematopoietic cells drives erythropoietin-independent erythropoiesis and induces myelofibrosis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 16930-5.
- KIESLINGER, M., WOLDMAN, I., MORIGGL, R., HOFMANN, J., MARINE, J. C., IHLE, J. N., BEUG, H. & DECKER, T. 2000. Antiapoptotic activity of Stat5 required during terminal stages of myeloid differentiation. *Genes Dev*, 14, 232-44.
- KIMURA, A., RIEGER, M. A., SIMONE, J. M., CHEN, W., WICKRE, M. C., ZHU, B. M., HOPPE, P. S., O'SHEA, J. J., SCHROEDER, T. & HENNIGHAUSEN, L. 2009. The transcription factors STAT5A/B regulate GM-CSF-mediated granulopoiesis. *Blood*, 114, 4721-8.

- KIRITO, K. & KOMATSU, N. 2002. [Signal transduction in hematopoiesis: a functional role of Stat 1 and Stat 3 in erythropoiesis and megakaryopoiesis]. *Rinsho Ketsueki*, 43, 278-81.
- KLEJMAN, A., SCHREINER, S. J., NIEBOROWSKA-SKORSKA, M., SLUPIANEK, A., WILSON, M., SMITHGALL, T. E. & SKORSKI, T. 2002. The Src family kinase Hck couples BCR/ABL to STAT5 activation in myeloid leukemia cells. *EMBO J*, 21, 5766-74.
- KLINGMULLER, U., LORENZ, U., CANTLEY, L. C., NEEL, B. G. & LODISH, H. F. 1995. Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell*, 80, 729-38.
- KONDO, M., WEISSMAN, I. L. & AKASHI, K. 1997. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*, 91, 661-72.
- KONG, Y., YOSHIDA, S., SAITO, Y., DOI, T., NAGATOSHI, Y., FUKATA, M., SAITO, N., YANG, S. M., IWAMOTO, C., OKAMURA, J., LIU, K. Y., HUANG, X. J., LU, D. P., SHULTZ, L. D., HARADA, M. & ISHIKAWA, F. 2008. CD34+CD38+CD19+ as well as CD34+CD38-CD19+ cells are leukemia-initiating cells with self-renewal capacity in human B-precursor ALL. *Leukemia*, 22, 1207-13.
- KOSCHMIEDER, S., GOTTGENS, B., ZHANG, P., IWASAKI-ARAI, J., AKASHI, K., KUTOK, J. L., DAYARAM, T., GEARY, K., GREEN, A. R., TENEN, D. G. & HUETTNER, C. S. 2005. Inducible chronic phase of myeloid leukemia with expansion of hematopoietic stem cells in a transgenic model of BCR-ABL leukemogenesis. *Blood*, 105, 324-34.
- KRALOVICS, R., PASSAMONTI, F., BUSER, A. S., TEO, S. S., TIEDT, R., PASSWEG, J. R., TICHELLI, A., CAZZOLA, M. & SKODA, R. C. 2005. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*, 352, 1779-90.
- KRAMER, A., HORNER, S., WILLER, A., FRUEHAUF, S., HOCHHAUS, A., HALLEK, M. & HEHLMANN, R. 1999. Adhesion to fibronectin stimulates proliferation of wild-type and bcr/abl-transfected murine hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 2087-92.
- KRAUSE, D. S. & VAN ETEN, R. A. 2005. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med*, 353, 172-87.
- KUDLACZ, E., CONKLYN, M., ANDRESEN, C., WHITNEY-PICKETT, C. & CHANGELIAN, P. 2008. The JAK-3 inhibitor CP-690550 is a potent anti-inflammatory agent in a murine model of pulmonary eosinophilia. *Eur J Pharmacol*, 582, 154-61.
- KUDLACZ, E., PERRY, B., SAWYER, P., CONKLYN, M., MCCURDY, S., BRISSETTE, W., FLANAGAN & CHANGELIAN, P. 2004. The novel JAK-3 inhibitor CP-690550 is a potent immunosuppressive agent in various murine models. *Am J Transplant*, 4, 51-7.
- LACOUT, C., PISANI, D. F., TULLIEZ, M., GACHELIN, F. M., VAINCHENKER, W. & VILLEVAL, J. L. 2006. JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. *Blood*, 108, 1652-60.
- LACRONIQUE, V., BOUREUX, A., MONNI, R., DUMON, S., MAUCHAUFFE, M., MAYEUX, P., GOUILLEUX, F., BERGER, R., GISSELBRECHT, S., GHYSDAEL, J. & BERNARD, O. A. 2000. Transforming properties of chimeric TEL-JAK proteins in Ba/F3 cells. *Blood*, 95, 2076-83.

- LACRONIQUE, V., BOUREUX, A., VALLE, V. D., POIREL, H., QUANG, C. T., MAUCHAUFFE, M., BERTHOU, C., LESSARD, M., BERGER, R., GHYSDAEL, J. & BERNARD, O. A. 1997. A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia. *Science*, 278, 1309-12.
- LANE, S. W., FAIRBAIRN, D. J., MCCARTHY, C., NANDINI, A., PERRY-KEENE, J. & KENNEDY, G. A. 2008. Leukaemia cutis in atypical chronic myeloid leukaemia with a t(9;22) (p24;q11.2) leading to BCR-JAK2 fusion. *Br J Haematol*, 142, 503.
- LASHO, T. L., TEFFERI, A., HOOD, J. D., VERSTOVSEK, S., GILLILAND, D. G. & PARDANANI, A. 2008. TG101348, a JAK2-selective antagonist, inhibits primary hematopoietic cells derived from myeloproliferative disorder patients with JAK2V617F, MPLW515K or JAK2 exon 12 mutations as well as mutation negative patients. *Leukemia*, 22, 1790-2.
- LEVINE, R. L. & GILLILAND, D. G. 2007. JAK-2 mutations and their relevance to myeloproliferative disease. *Curr Opin Hematol*, 14, 43-7.
- LEVINE, R. L. & GILLILAND, D. G. 2008. Myeloproliferative disorders. *Blood*, 112, 2190-8.
- LEVINE, R. L., PARDANANI, A., TEFFERI, A. & GILLILAND, D. G. 2007. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nat Rev Cancer*, 7, 673-83.
- LEVINE, R. L., WADLEIGH, M., COOLS, J., EBERT, B. L., WERNIG, G., HUNTLY, B. J., BOGGON, T. J., WLODARSKA, I., CLARK, J. J., MOORE, S., ADELSPERGER, J., KOO, S., LEE, J. C., GABRIEL, S., MERCHER, T., D'ANDREA, A., FROHLING, S., DOHNER, K., MARYNEN, P., VANDENBERGHE, P., MESA, R. A., TEFFERI, A., GRIFFIN, J. D., ECK, M. J., SELLERS, W. R., MEYERSON, M., GOLUB, T. R., LEE, S. J. & GILLILAND, D. G. 2005. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*, 7, 387-97.
- LEVITZKI, A. 2013. Tyrosine kinase inhibitors: views of selectivity, sensitivity, and clinical performance. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 53, 161-85.
- LI, G., WANG, Z., ZHANG, Y., KANG, Z., HAVIERNIKOVA, E., CUI, Y., HENNIGHAUSEN, L., MORIGGL, R., WANG, D., TSE, W. & BUNTING, K. D. 2007a. STAT5 requires the N-domain to maintain hematopoietic stem cell repopulating function and appropriate lymphoid-myeloid lineage output. *Exp Hematol*, 35, 1684-94.
- LI, J., SPENSBERGER, D., AHN, J. S., ANAND, S., BEER, P. A., GHEVAERT, C., CHEN, E., FORRAI, A., SCOTT, L. M., FERREIRA, R., CAMPBELL, P. J., WATSON, S. P., LIU, P., ERBER, W. N., HUNTLY, B. J., OTTERSBAACH, K. & GREEN, A. R. 2010. JAK2 V617F impairs hematopoietic stem cell function in a conditional knock-in mouse model of JAK2 V617F-positive essential thrombocythemia. *Blood*, 116, 1528-38.
- LI, Q. & DANG, C. V. 1999. c-Myc overexpression uncouples DNA replication from mitosis. *Mol Cell Biol*, 19, 5339-51.
- LI, S., ILARIA, R. L., JR., MILLION, R. P., DALEY, G. Q. & VAN ETTEN, R. A. 1999. The P190, P210, and P230 forms of the BCR/ABL oncogene induce a similar chronic myeloid leukemia-like syndrome in mice but have different lymphoid leukemogenic activity. *J Exp Med*, 189, 1399-412.
- LI, Y., CLOUGH, N., SUN, X., YU, W., ABBOTT, B. L., HOGAN, C. J. & DAI, Z. 2007b. Bcr-Abl induces abnormal cytoskeleton remodeling, beta1 integrin

- clustering and increased cell adhesion to fibronectin through the Abl interactor 1 pathway. *J Cell Sci*, 120, 1436-46.
- LI, Z., DULLMANN, J., SCHIEDLMEIER, B., SCHMIDT, M., VON KALLE, C., MEYER, J., FORSTER, M., STOCKING, C., WAHLERS, A., FRANK, O., OSTERTAG, W., KUHLCHE, K., ECKERT, H. G., FEHSE, B. & BAUM, C. 2002. Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science*, 296, 497.
- LIN, W. C., SCHMIDT, J. W., CREAMER, B. A., TRIPLETT, A. A. & WAGNER, K. U. 2013. Gain-of-function of Stat5 leads to excessive granulopoiesis and lethal extravasation of granulocytes to the lung. *PLoS One*, 8, e60902.
- LIU, B., LIAO, J., RAO, X., KUSHNER, S. A., CHUNG, C. D., CHANG, D. D. & SHUAI, K. 1998. Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 10626-31.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*, 25, 402-8.
- LOCK, R. B., LIEM, N., FARNSWORTH, M. L., MILROSS, C. G., XUE, C., TAJBAKHS, M., HABER, M., NORRIS, M. D., MARSHALL, G. M. & RICE, A. M. 2002. The nonobese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD/SCID) mouse model of childhood acute lymphoblastic leukemia reveals intrinsic differences in biologic characteristics at diagnosis and relapse. *Blood*, 99, 4100-8.
- LORD, J. D., MCINTOSH, B. C., GREENBERG, P. D. & NELSON, B. H. 2000. The IL-2 receptor promotes lymphocyte proliferation and induction of the c-myc, bcl-2, and bcl-x genes through the trans-activation domain of Stat5. *J Immunol*, 164, 2533-41.
- LU, X., LEVINE, R., TONG, W., WERNIG, G., PIKMAN, Y., ZARNEGAR, S., GILLILAND, D. G. & LODISH, H. 2005. Expression of a homodimeric type I cytokine receptor is required for JAK2V617F-mediated transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 18962-7.
- MALAISE, M., NEUMEIER, M., BOTTERON, C., DOHNER, K., REINHARDT, D., SCHLEGELBERGER, B., GOHRING, G., GRUHN, B., DEBATIN, K. M. & CORBACIOGLU, S. 2011. Stable and reproducible engraftment of primary adult and pediatric acute myeloid leukemia in NSG mice. *Leukemia*, 25, 1635-9.
- MALAKHOVA, O. A., YAN, M., MALAKHOV, M. P., YUAN, Y., RITCHIE, K. J., KIM, K. I., PETERSON, L. F., SHUAI, K. & ZHANG, D. E. 2003. Protein ISGylation modulates the JAK-STAT signaling pathway. *Genes Dev*, 17, 455-60.
- MARTY, C., LACOUT, C., MARTIN, A., HASAN, S., JACQUOT, S., BIRLING, M. C., VAINCHENKER, W. & VILLEVAL, J. L. 2010. Myeloproliferative neoplasm induced by constitutive expression of JAK2V617F in knock-in mice. *Blood*, 116, 783-7.
- MARU, Y. & WITTE, O. N. 1991. The BCR gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon. *Cell*, 67, 459-68.
- MATSUMOTO, A., MASUHARA, M., MITSUI, K., YOKOUCHI, M., OHTSUBO, M., MISAWA, H., MIYAJIMA, A. & YOSHIMURA, A. 1997. CIS, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation. *Blood*, 89, 3148-54.

- MAZURIER, F., DOEDENS, M., GAN, O. I. & DICK, J. E. 2003. Rapid myeloerythroid repopulation after intrafemoral transplantation of NOD-SCID mice reveals a new class of human stem cells. *Nat Med*, 9, 959-63.
- MCDOOM, I., MA, X., KIRABO, A., LEE, K. Y., OSTROV, D. A. & SAYESKI, P. P. 2008. Identification of tyrosine 972 as a novel site of Jak2 tyrosine kinase phosphorylation and its role in Jak2 activation. *Biochemistry*, 47, 8326-34.
- MCLAUGHLIN, J., CHIANESE, E. & WITTE, O. N. 1987. In vitro transformation of immature hematopoietic cells by the P210 BCR/ABL oncogene product of the Philadelphia chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 6558-62.
- MCWHIRTER, J. R., GALASSO, D. L. & WANG, J. Y. 1993. A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Mol Cell Biol*, 13, 7587-95.
- MESA, R. A., GOTLIB, J., GUPTA, V., CATALANO, J. V., DEININGER, M. W., SHIELDS, A. L., MILLER, C. B., SILVER, R. T., TALPAZ, M., WINTON, E. F., HARVEY, J. H., HARE, T., ERICKSON-VIITANEN, S., SUN, W., SANDOR, V., LEVY, R. S., KANTARJIAN, H. M. & VERSTOVSEK, S. 2013. Effect of ruxolitinib therapy on myelofibrosis-related symptoms and other patient-reported outcomes in COMFORT-I: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Oncol*, 31, 1285-92.
- METCALF, D., GREENHALGH, C. J., VINEY, E., WILLSON, T. A., STARR, R., NICOLA, N. A., HILTON, D. J. & ALEXANDER, W. S. 2000. Gigantism in mice lacking suppressor of cytokine signalling-2. *Nature*, 405, 1069-73.
- MEYER, L. H., ECKHOFF, S. M., QUEUDEVILLE, M., KRAUS, J. M., GIORDAN, M., STURSBURG, J., ZANGRANDO, A., VENDRAMINI, E., MORICKE, A., ZIMMERMANN, M., SCHRAUDER, A., LAHR, G., HOLZMANN, K., SCHRAPPE, M., BASSO, G., STAHNKE, K., KESTLER, H. A., TE KRONNIE, G. & DEBATIN, K. M. 2011. Early relapse in ALL is identified by time to leukemia in NOD/SCID mice and is characterized by a gene signature involving survival pathways. *Cancer Cell*, 19, 206-17.
- MILICI, A. J., KUDLACZ, E. M., AUDOLY, L., ZWILLICH, S. & CHANGELIAN, P. 2008. Cartilage preservation by inhibition of Janus kinase 3 in two rodent models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 10, R14.
- MILLION, R. P., HAKAWA, N., ROUMIANTSEV, S., VARTICOVSKI, L. & VAN ETEN, R. A. 2004. A direct binding site for Grb2 contributes to transformation and leukemogenesis by the Tel-Abl (ETV6-Abl) tyrosine kinase. *Mol Cell Biol*, 24, 4685-95.
- MINAMI, M., INOUE, M., WEI, S., TAKEDA, K., MATSUMOTO, M., KISHIMOTO, T. & AKIRA, S. 1996. STAT3 activation is a critical step in gp130-mediated terminal differentiation and growth arrest of a myeloid cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 3963-6.
- MIZUGUCHI, H., XU, Z., ISHII-WATABE, A., UCHIDA, E. & HAYAKAWA, T. 2000. IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector. *Mol Ther*, 1, 376-82.
- MONNI, R., SANTOS, S. C., MAUCHAUFFE, M., BERGER, R., GHYSDAEL, J., GOUILLEUX, F., GISSELBRECHT, S., BERNARD, O. & PENARD-LACRONIQUE, V. 2001. The TEL-Jak2 oncoprotein induces Socs1 expression and altered cytokine response in Ba/F3 cells. *Oncogene*, 20, 849-58.

- MONTINI, E., CESANA, D., SCHMIDT, M., SANVITO, F., PONZONI, M., BARTHOLOMAE, C., SERGI SERGI, L., BENEDICENTI, F., AMBROSI, A., DI SERIO, C., DOGLIONI, C., VON KALLE, C. & NALDINI, L. 2006. Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration. *Nat Biotechnol*, 24, 687-96.
- MORELAND, L., WILLIAMS, W., SHERLE, P., SHI, J., NEWTON, R., MCKEEVER E., FRIDMAN, J., BURN, T., VADDI, K., LEVY, R. 2008. A randomized placebo-controlled study of INCB018424, a selective Janus kinase 1&2 inhibitor in rheumatoid arthritis. http://library.corporate-ir.net/library/69/697/69764/items/312447/ACR_PRES.pdf
- MORTUZA, F. Y., PAPAIOANNOU, M., MOREIRA, I. M., COYLE, L. A., GAMEIRO, P., GANDINI, D., PRENTICE, H. G., GOLDSTONE, A., HOFFBRAND, A. V. & FORONI, L. 2002. Minimal residual disease tests provide an independent predictor of clinical outcome in adult acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*, 20, 1094-104.
- MOWEN, K. A., TANG, J., ZHU, W., SCHURTER, B. T., SHUAI, K., HERSCHMAN, H. R. & DAVID, M. 2001. Arginine methylation of STAT1 modulates IFNalpha/beta-induced transcription. *Cell*, 104, 731-41.
- MULLALLY, A. & EBERT, B. L. 2010. STATistical power of clonal analysis: differential STAT1 pathway activation downstream of the JAK2V617F mutation. *Cancer Cell*, 18, 405-6.
- MULLER, A. J., YOUNG, J. C., PENDERGAST, A. M., PONDEL, M., LANDAU, N. R., LITTMAN, D. R. & WITTE, O. N. 1991. BCR first exon sequences specifically activate the BCR/ABL tyrosine kinase oncogene of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. *Mol Cell Biol*, 11, 1785-92.
- MURATI, A., GELSI-BOYER, V., ADELAIDE, J., PEROT, C., TALMANT, P., GIRAUDIER, S., LODE, L., LETESSIER, A., DELAVAL, B., BRUNEL, V., IMBERT, M., GARAND, R., XERRI, L., BIRNBAUM, D., MOZZICONACCI, M. J. & CHAFFANET, M. 2005. PCM1-JAK2 fusion in myeloproliferative disorders and acute erythroid leukemia with t(8;9) translocation. *Leukemia*, 19, 1692-6.
- MUSSO, T., JOHNSTON, J. A., LINNEKIN, D., VARESIO, L., ROWE, T. K., O'SHEA, J. J. & MCVICAR, D. W. 1995. Regulation of JAK3 expression in human monocytes: phosphorylation in response to interleukins 2, 4, and 7. *J Exp Med*, 181, 1425-31.
- NAKA, T., NARAZAKI, M., HIRATA, M., MATSUMOTO, T., MINAMOTO, S., AONO, A., NISHIMOTO, N., KAJITA, T., TAGA, T., YOSHIZAKI, K., AKIRA, S. & KISHIMOTO, T. 1997. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature*, 387, 924-9.
- NAKAJIMA, H., LIU, X. W., WYNshaw-BORIS, A., ROSENTHAL, L. A., IMADA, K., FINBLOOM, D. S., HENNIGHAUSEN, L. & LEONARD, W. J. 1997. An indirect effect of Stat5a in IL-2-induced proliferation: a critical role for Stat5a in IL-2-mediated IL-2 receptor alpha chain induction. *Immunity*, 7, 691-701.
- NEUBAUER, H., CUMANO, A., MULLER, M., WU, H., HUFFSTADT, U. & PFEFFER, K. 1998. Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell*, 93, 397-409.
- NICHOLSON, S. E., DE SOUZA, D., FABRI, L. J., CORBIN, J., WILLSON, T. A., ZHANG, J. G., SILVA, A., ASIMAKIS, M., FARLEY, A., NASH, A. D., METCALF, D.,

- HILTON, D. J., NICOLA, N. A. & BACA, M. 2000. Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 6493-8.
- NOSAKA, T., KAWASHIMA, T., MISAWA, K., IKUTA, K., MUI, A. L. & KITAMURA, T. 1999. STAT5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells. *EMBO J*, 18, 4754-65.
- NOSAKA, T., VAN DEURSEN, J. M., TRIPP, R. A., THIERFELDER, W. E., WITTHUHN, B. A., MCMICKLE, A. P., DOHERTY, P. C., GROSVELD, G. C. & IHLE, J. N. 1995. Defective lymphoid development in mice lacking Jak3. *Science*, 270, 800-2.
- NOTTA, F., DOULATOV, S. & DICK, J. E. 2010. Engraftment of human hematopoietic stem cells is more efficient in female NOD/SCID/IL-2Rgc-null recipients. *Blood*, 115, 3704-7.
- ONISHI, M., NOSAKA, T., MISAWA, K., MUI, A. L., GORMAN, D., MCMAHON, M., MIYAJIMA, A. & KITAMURA, T. 1998. Identification and characterization of a constitutively active STAT5 mutant that promotes cell proliferation. *Mol Cell Biol*, 18, 3871-9.
- ORFORD, K. W. & SCADDEN, D. T. 2008. Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation. *Nat Rev Genet*, 9, 115-28.
- OSAWA, M., HANADA, K., HAMADA, H. & NAKAUCHI, H. 1996. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*, 273, 242-5.
- PALLIS, M., ZHU, Y. M. & RUSSELL, N. H. 1997. Bcl-x(L) is heterogenously expressed by acute myeloblastic leukaemia cells and is associated with autonomous growth in vitro and with P-glycoprotein expression. *Leukemia*, 11, 945-9.
- PANE, F., FRIGERI, F., SINDONA, M., LUCIANO, L., FERRARA, F., CIMINO, R., MELONI, G., SAGLIO, G., SALVATORE, F. & ROTOLI, B. 1996. Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). *Blood*, 88, 2410-4.
- PANJARIAN, S., IACOB, R. E., CHEN, S., ENGEN, J. R. & SMITHGALL, T. E. 2013. Structure and dynamic regulation of Abl kinases. *J Biol Chem*, 288, 5443-50.
- PARDANANI, A. 2008. JAK2 inhibitor therapy in myeloproliferative disorders: rationale, preclinical studies and ongoing clinical trials. *Leukemia*, 22, 23-30.
- PARDANANI, A., GOTLIB, J. R., JAMIESON, C., CORTES, J. E., TALPAZ, M., STONE, R. M., SILVERMAN, M. H., GILLILAND, D. G., SHORR, J. & TEFFERI, A. 2011. Safety and efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *J Clin Oncol*, 29, 789-96.
- PARDANANI, A., HOOD, J., LASHO, T., LEVINE, R. L., MARTIN, M. B., NORONHA, G., FINKE, C., MAK, C. C., MESA, R., ZHU, H., SOLL, R., GILLILAND, D. G. & TEFFERI, A. 2007a. TG101209, a small molecule JAK2-selective kinase inhibitor potently inhibits myeloproliferative disorder-associated JAK2V617F and MPLW515L/K mutations. *Leukemia*, 21, 1658-68.
- PARDANANI, A., HOOD, J., LASHO, T., LEVINE, R. L., MARTIN, M. B., NORONHA, G., FINKE, C., MAK, C. C., MESA, R., ZHU, H., SOLL, R., GILLILAND, D. G. & TEFFERI, A. 2007b. TG101209, a small molecule JAK2-selective kinase

- inhibitor potently inhibits myeloproliferative disorder-associated JAK2V617F and MPLW515L/K mutations. *Leukemia*.
- PARDANANI, A., LABORDE, R. R., LASHO, T. L., FINKE, C., BEGNA, K., AL-KALI, A., HOGAN, W. J., LITZOW, M. R., LEONTOVICH, A., KOWALSKI, M. & TEFFERI, A. 2013. Safety and efficacy of CYT387, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *Leukemia*, 27, 1322-7.
- PARGANAS, E., WANG, D., STRAVOPODIS, D., TOPHAM, D. J., MARINE, J. C., TEGLUND, S., VANIN, E. F., BODNER, S., COLAMONICI, O. R., VAN DEURSEN, J. M., GROSVELD, G. & IHLE, J. N. 1998. Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell*, 93, 385-95.
- PEAR, W. S., MILLER, J. P., XU, L., PUI, J. C., SOFFER, B., QUACKENBUSH, R. C., PENDERGAST, A. M., BRONSON, R., ASTER, J. C., SCOTT, M. L. & BALTIMORE, D. 1998. Efficient and rapid induction of a chronic myelogenous leukemia-like myeloproliferative disease in mice receiving P210 bcr/abl-transduced bone marrow. *Blood*, 92, 3780-92.
- PEAULT, B. & TAVIAN, M. 2003. Hematopoietic stem cell emergence in the human embryo and fetus. *Ann N Y Acad Sci*, 996, 132-40.
- PEETERS, P., RAYNAUD, S. D., COOLS, J., WLODARSKA, I., GROSGEORGE, J., PHILIP, P., MONPOUX, F., VAN ROMPAEY, L., BAENS, M., VAN DEN BERGHE, H. & MARYNEN, P. 1997. Fusion of TEL, the ETS-variant gene 6 (ETV6), to the receptor-associated kinase JAK2 as a result of t(9;12) in a lymphoid and t(9;15;12) in a myeloid leukemia. *Blood*, 90, 2535-40.
- PENDERGAST, A. M., CLARK, R., KAWASAKI, E. S., MCCORMICK, F. P. & WITTE, O. N. 1989. Baculovirus expression of functional P210 BCR-ABL oncogene product. *Oncogene*, 4, 759-66.
- PENDERGAST, A. M., QUILLIAM, L. A., CRIPE, L. D., BASSING, C. H., DAI, Z., LI, N., BATZER, A., RABUN, K. M., DER, C. J., SCHLESSINGER, J. & ET AL. 1993. BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell*, 75, 175-85.
- PIERCE, A., WILLIAMSON, A., JAWORSKA, E., GRIFFITHS, J. R., TAYLOR, S., WALKER, M., O'DEA, M. A., SPOONCER, E., UNWIN, R. D., POOLMAN, T., RAY, D. & WHETTON, A. D. 2012. Identification of nuclear protein targets for six leukemogenic tyrosine kinases governed by post-translational regulation. *PLoS One*, 7, e38928.
- PLIMACK, E. R., LORUSSO, P. M., MCCOON, P., TANG, W., KREBS, A. D., CURT, G. & ECKHARDT, S. G. 2013. AZD1480: a phase I study of a novel JAK2 inhibitor in solid tumors. *Oncologist*, 18, 819-20.
- POITRAS, J. L., DAL CIN, P., ASTER, J. C., DEANGELO, D. J. & MORTON, C. C. 2008. Novel SSBP2-JAK2 fusion gene resulting from a t(5;9)(q14.1;p24.1) in pre-B acute lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*, 47, 884-9.
- POLAK, R. & BUITENHUIS, M. 2012. The PI3K/PKB signaling module as key regulator of hematopoiesis: implications for therapeutic strategies in leukemia. *Blood*, 119, 911-23.
- PURANDARE, A. V., MCDEVITT, T. M., WAN, H., YOU, D., PENHALLOW, B., HAN, X., VUPPUGALLA, R., ZHANG, Y., RUEPP, S. U., TRAINOR, G. L., LOMBARDO, L., PEDICORD, D., GOTTARDIS, M. M., ROSS-MACDONALD, P., DE SILVA, H., HOSBACH, J., EMANUEL, S. L., BLAT, Y., FITZPATRICK, E., TAYLOR, T. L., MCINTYRE, K. W., MICHAUD, E., MULLIGAN, C., LEE, F. Y., WOOLFSON, A., LASHO, T. L., PARDANANI, A., TEFFERI, A. & LORENZI, M. V. 2012.

- Characterization of BMS-911543, a functionally selective small-molecule inhibitor of JAK2. *Leukemia*, 26, 280-8.
- PUTTINI, M., COLUCCIA, A. M., BOSCHELLI, F., CLERIS, L., MARCHESI, E., DONELLA-DEANA, A., AHMED, S., REDAELLI, S., PIAZZA, R., MAGISTRONI, V., ANDREONI, F., SCAPOZZA, L., FORMELLI, F. & GAMBACORTI-PASSERINI, C. 2006. In vitro and in vivo activity of SKI-606, a novel Src-Abl inhibitor, against imatinib-resistant Bcr-Abl+ neoplastic cells. *Cancer Res*, 66, 11314-22.
- QUINTAS-CARDAMA, A. & VERSTOVSEK, S. 2011. New JAK2 inhibitors for myeloproliferative neoplasms. *Expert Opin Investig Drugs*, 20, 961-72.
- RAM, P. A. & WAXMAN, D. J. 2000. Role of the cytokine-inducible SH2 protein CIS in desensitization of STAT5b signaling by continuous growth hormone. *J Biol Chem*, 275, 39487-96.
- RAMAKRISHNAN, V., KIMLINGER, T., HAUG, J., TIMM, M., WELLIK, L., HALLING, T., PARDANANI, A., TEFFERI, A., RAJKUMAR, S. V. & KUMAR, S. 2010. TG101209, a novel JAK2 inhibitor, has significant in vitro activity in multiple myeloma and displays preferential cytotoxicity for CD45+ myeloma cells. *Am J Hematol*, 85, 675-86.
- REITER, A., WALZ, C., WATMORE, A., SCHOCH, C., BLAU, I., SCHLEGELBERGER, B., BERGER, U., TELFORD, N., ARULIAH, S., YIN, J. A., VANSTRAELEN, D., BARKER, H. F., TAYLOR, P. C., O'DRISCOLL, A., BENEDETTI, F., RUDOLPH, C., KOLB, H. J., HOCHHAUS, A., HEHLMANN, R., CHASE, A. & CROSS, N. C. 2005. The t(8;9)(p22;p24) is a recurrent abnormality in chronic and acute leukemia that fuses PCM1 to JAK2. *Cancer Res*, 65, 2662-7.
- RIO, P., SEGOVIA, J. C., HANENBERG, H., CASADO, J. A., MARTINEZ, J., GOTTSCHKE, K., CHENG, N. C., VAN DE VRUGT, H. J., ARWERT, F., JOENJE, H. & BUEREN, J. A. 2002. In vitro phenotypic correction of hematopoietic progenitors from Fanconi anemia group A knockout mice. *Blood*, 100, 2032-9.
- RODIG, S. J., MERAZ, M. A., WHITE, J. M., LAMPE, P. A., RILEY, J. K., ARTHUR, C. D., KING, K. L., SHEEHAN, K. C., YIN, L., PENNICA, D., JOHNSON, E. M., JR. & SCHREIBER, R. D. 1998. Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses. *Cell*, 93, 373-83.
- RON, D., ZANNINI, M., LEWIS, M., WICKNER, R. B., HUNT, L. T., GRAZIANI, G., TRONICK, S. R., AARONSON, S. A. & EVA, A. 1991. A region of proto-dbl essential for its transforming activity shows sequence similarity to a yeast cell cycle gene, CDC24, and the human breakpoint cluster gene, bcr. *New Biol*, 3, 372-9.
- ROSENGREN, S., CORR, M., FIRESTEIN, G. S. & BOYLE, D. L. 2012. The JAK inhibitor CP-690,550 (tofacitinib) inhibits TNF-induced chemokine expression in fibroblast-like synoviocytes: autocrine role of type I interferon. *Ann Rheum Dis*, 71, 440-7.
- RUBINCHIK, S., DING, R., QIU, A. J., ZHANG, F. & DONG, J. 2000. Adenoviral vector which delivers FasL-GFP fusion protein regulated by the tet-inducible expression system. *Gene Ther*, 7, 875-85.
- RUI, L., EMRE, N. C., KRUHLAK, M. J., CHUNG, H. J., STEIDL, C., SLACK, G., WRIGHT, G. W., LENZ, G., NGO, V. N., SHAFFER, A. L., XU, W., ZHAO, H., YANG, Y., LAMY, L., DAVIS, R. E., XIAO, W., POWELL, J., MALONEY, D., THOMAS, C. J., MOLLER, P., ROSENWALD, A., OTT, G., MULLER-HERMELINK, H. K.,

- SAVAGE, K., CONNORS, J. M., RIMSZA, L. M., CAMPO, E., JAFFE, E. S., DELABIE, J., SMELAND, E. B., WEISENBURGER, D. D., CHAN, W. C., GASCOYNE, R. D., LEVENS, D. & STAUDT, L. M. 2010. Cooperative epigenetic modulation by cancer amplicon genes. *Cancer Cell*, 18, 590-605.
- RUTHERFORD, M. N., BAYLY, G. R., MATTHEWS, B. P., OKUDA, T., DINJENS, W. M., KONDOH, H. & LEBRUN, D. P. 2001. The leukemogenic transcription factor E2a-Pbx1 induces expression of the putative N-myc and p53 target gene NDRG1 in Ba/F3 cells. *Leukemia*, 15, 362-70.
- SAHARINEN, P. & SILVENNOINEN, O. 2002. The pseudokinase domain is required for suppression of basal activity of Jak2 and Jak3 tyrosine kinases and for cytokine-inducible activation of signal transduction. *J Biol Chem*, 277, 47954-63.
- SAHARINEN, P., TAKALUOMA, K. & SILVENNOINEN, O. 2000. Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain. *Mol Cell Biol*, 20, 3387-95.
- SANTOS, F. P. & VERSTOVSEK, S. 2011. JAK2 inhibitors: what's the true therapeutic potential? *Blood Rev*, 25, 53-63.
- SAYYAH, J., GNANASAMBANDAN, K., KAMARAJUGADDA, S., TSUDA, S., CALDWELL-BUSBY, J. & SAYESKI, P. P. 2011. Phosphorylation of Y372 is critical for Jak2 tyrosine kinase activation. *Cell Signal*, 23, 1806-15.
- SCHINDLER, C. W. 2002. Series introduction. JAK-STAT signaling in human disease. *J Clin Invest*, 109, 1133-7.
- SCHINDLER, T., BORNMANN, W., PELLICENA, P., MILLER, W. T., CLARKSON, B. & KURIYAN, J. 2000. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science*, 289, 1938-42.
- SCHWALLER, J., FRANTSVE, J., ASTER, J., WILLIAMS, I. R., TOMASSON, M. H., ROSS, T. S., PEETERS, P., VAN ROMPAEY, L., VAN ETEN, R. A., ILARIA, R., JR., MARYNEN, P. & GILLILAND, D. G. 1998. Transformation of hematopoietic cell lines to growth-factor independence and induction of a fatal myelo- and lymphoproliferative disease in mice by retrovirally transduced TEL/JAK2 fusion genes. *Embo J*, 17, 5321-33.
- SEITA, J. & WEISSMAN, I. L. 2010. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2, 640-53.
- SENYUK, V., RINALDI, C. R., LI, D., CATTANEO, F., STOJANOVIC, A., PANE, F., DU, X., MAHMUD, N., DICKSTEIN, J. & NUCIFORA, G. 2009. Consistent up-regulation of Stat3 Independently of Jak2 mutations in a new murine model of essential thrombocythemia. *Cancer Res*, 69, 262-71.
- SHANKARANARAYANAN, P., CHAITIDIS, P., KUHN, H. & NIGAM, S. 2001. Acetylation by histone acetyltransferase CREB-binding protein/p300 of STAT6 is required for transcriptional activation of the 15-lipoxygenase-1 gene. *J Biol Chem*, 276, 42753-60.
- SHULTZ, L. D., SCHWEITZER, P. A., CHRISTIANSON, S. W., GOTT, B., SCHWEITZER, I. B., TENNENT, B., MCKENNA, S., MOBRAATEN, L., RAJAN, T. V., GREINER, D. L. & ET AL. 1995. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J Immunol*, 154, 180-91.
- SINIBALDI, D., WHARTON, W., TURKSON, J., BOWMAN, T., PLEDGER, W. J. & JOVE, R. 2000. Induction of p21WAF1/CIP1 and cyclin D1 expression by

- the Src oncoprotein in mouse fibroblasts: role of activated STAT3 signaling. *Oncogene*, 19, 5419-27.
- SKORSKI, T. 2008. BCR/ABL, DNA damage and DNA repair: implications for new treatment concepts. *Leuk Lymphoma*, 49, 610-4.
- SOCOLOVSKY, M., FALLON, A. E., WANG, S., BRUGNARA, C. & LODISH, H. F. 1999. Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a-/-5b-/- mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell*, 98, 181-91.
- SODERBERG, S. S., KARLSSON, G. & KARLSSON, S. 2009. Complex and context dependent regulation of hematopoiesis by TGF-beta superfamily signaling. *Ann N Y Acad Sci*, 1176, 55-69.
- SPANGRUDE, G. J., HEIMFELD, S. & WEISSMAN, I. L. 1988. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*, 241, 58-62.
- SPIEGEL, A., KOLLET, O., PELED, A., ABEL, L., NAGLER, A., BIELORAI, B., RECHAVI, G., VORMOOR, J. & LAPIDOT, T. 2004. Unique SDF-1-induced activation of human precursor-B ALL cells as a result of altered CXCR4 expression and signaling. *Blood*, 103, 2900-7.
- STARR, R., WILLSON, T. A., VINEY, E. M., MURRAY, L. J., RAYNER, J. R., JENKINS, B. J., GONDA, T. J., ALEXANDER, W. S., METCALF, D., NICOLA, N. A. & HILTON, D. J. 1997. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature*, 387, 917-21.
- STERNBERG, D. W. & GILLILAND, D. G. 2004. The role of signal transducer and activator of transcription factors in leukemogenesis. *J Clin Oncol*, 22, 361-71.
- SUN, Y., MORETTI, L., GIACALONE, N. J., SCHLEICHER, S., SPEIRS, C. K., CARBONE, D. P. & LU, B. 2011. Inhibition of JAK2 signaling by TG101209 enhances radiotherapy in lung cancer models. *J Thorac Oncol*, 6, 699-706.
- SWIFT, S., LORENS, J., ACHACOSO, P. & NOLAN, G. P. 2001. Rapid production of retroviruses for efficient gene delivery to mammalian cells using 293T cell-based systems. *Curr Protoc Immunol*, Chapter 10, Unit 10 17C.
- TAKEDA, K., NOGUCHI, K., SHI, W., TANAKA, T., MATSUMOTO, M., YOSHIDA, N., KISHIMOTO, T. & AKIRA, S. 1997. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 3801-4.
- TANAKA, M., SAWADA, M., MIURA, M. & MARUNOUCHI, T. 1998. Insulin-like growth factor-I analogue prevents apoptosis mediated through an interleukin-1 beta converting enzyme (caspase-1)-like protease of cerebellar external granular layer neurons: developmental stage-specific mechanisms of neuronal cell death. *Neuroscience*, 84, 89-100.
- TAVIAN, M. & PEAULT, B. 2005. Embryonic development of the human hematopoietic system. *Int J Dev Biol*, 49, 243-50.
- TEFFERI, A. & GILLILAND, D. G. 2007. Oncogenes in myeloproliferative disorders. *Cell Cycle*, 6, 550-66.
- TEGLUND, S., MCKAY, C., SCHUETZ, E., VAN DEURSEN, J. M., STRAVOPODIS, D., WANG, D., BROWN, M., BODNER, S., GROSVELD, G. & IHLE, J. N. 1998. Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell*, 93, 841-50.
- THIERFELDER, W. E., VAN DEURSEN, J. M., YAMAMOTO, K., TRIPP, R. A., SARAWAR, S. R., CARSON, R. T., SANGSTER, M. Y., VIGNALI, D. A., DOHERTY, P. C., GROSVELD, G. C. & IHLE, J. N. 1996. Requirement for

- Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature*, 382, 171-4.
- TIEDT, R., HAO-SHEN, H., SOBAS, M. A., LOOSER, R., DIRNHOFER, S., SCHWALLER, J. & SKODA, R. C. 2008. Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. *Blood*, 111, 3931-40.
- TUSSIE-LUNA, M. I., BAYARSAIHAN, D., SETO, E., RUDDLE, F. H. & ROY, A. L. 2002. Physical and functional interactions of histone deacetylase 3 with TFII-I family proteins and PIASxbeta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 12807-12.
- UDY, G. B., TOWERS, R. P., SNELL, R. G., WILKINS, R. J., PARK, S. H., RAM, P. A., WAXMAN, D. J. & DAVEY, H. W. 1997. Requirement of STAT5b for sexual dimorphism of body growth rates and liver gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 7239-44.
- UNGUREANU, D., SAHARINEN, P., JUNTILA, I., HILTON, D. J. & SILVENNOINEN, O. 2002. Regulation of Jak2 through the ubiquitin-proteasome pathway involves phosphorylation of Jak2 on Y1007 and interaction with SOCS-1. *Mol Cell Biol*, 22, 3316-26.
- VAINCHENKER, W. & CONSTANTINESCU, S. N. 2013. JAK/STAT signaling in hematological malignancies. *Oncogene*, 32, 2601-13.
- VAN ETEN, R. A. 2001. Pathogenesis and treatment of Ph+ leukemia: recent insights from mouse models. *Curr Opin Hematol*, 8, 224-30.
- VAN RHEE, F., MARKS, D. I., LIN, F., SZYDLO, R. M., HOCHHAUS, A., TRELEAVEN, J., DELORD, C., CROSS, N. C. & GOLDMAN, J. M. 1995. Quantification of residual disease in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia: comparison of blood and bone marrow. *Leukemia*, 9, 329-35.
- VAN ROOSBROECK, K., COX, L., TOUSSEYN, T., LAHORTIGA, I., GIELEN, O., CAUWELIER, B., DE PAEPE, P., VERHOEF, G., MARYNEN, P., VANDENBERGHE, P., DE WOLF-PEETERS, C., COOLS, J. & WLODARSKA, I. 2011. JAK2 rearrangements, including the novel SEC31A-JAK2 fusion, are recurrent in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*, 117, 4056-64.
- VELAZQUEZ, L., FELLOUS, M., STARK, G. R. & PELLEGRINI, S. 1992. A protein tyrosine kinase in the interferon alpha/beta signaling pathway. *Cell*, 70, 313-22.
- VERSTOVSEK, S. 2010. Therapeutic potential of Janus-activated kinase-2 inhibitors for the management of myelofibrosis. *Clin Cancer Res*, 16, 1988-96.
- VERSTOVSEK, S., KANTARJIAN, H., MESA, R. A., PARDANANI, A. D., CORTES-FRANCO, J., THOMAS, D. A., ESTROV, Z., FRIDMAN, J. S., BRADLEY, E. C., ERICKSON-VIITANEN, S., VADDI, K., LEVY, R. & TEFFERI, A. 2010. Safety and efficacy of INCB018424, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *N Engl J Med*, 363, 1117-27.
- VISCO, C., RUGGERI, M., LAURA EVANGELISTA, M., STASI, R., ZANOTTI, R., GIARETTA, I., AMBROSETTI, A., MADEO, D., PIZZOLO, G. & RODEGHIERO, F. 2008. Impact of immune thrombocytopenia on the clinical course of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 111, 1110-6.
- VONCKEN, J. W., KAARTINEN, V., PATTENGAL, P. K., GERMERAAD, W. T., GROFFEN, J. & HEISTERKAMP, N. 1995. BCR/ABL P210 and P190 cause distinct leukemia in transgenic mice. *Blood*, 86, 4603-11.

- VONCKEN, J. W., MORRIS, C., PATTENGAL, P., DENNERT, G., KIKLY, C., GROFFEN, J. & HEISTERKAMP, N. 1992. Clonal development and karyotype evolution during leukemogenesis of BCR/ABL transgenic mice. *Blood*, 79, 1029-36.
- WARD, A. C., TOUW, I. & YOSHIMURA, A. 2000. The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis. *Blood*, 95, 19-29.
- WARMUTH, M., KIM, S., GU, X. J., XIA, G. & ADRIAN, F. 2007. Ba/F3 cells and their use in kinase drug discovery. *Curr Opin Oncol*, 19, 55-60.
- WARSCH, W., KOLLMANN, K., ECKELHART, E., FAJMAN, S., CERNY-REITERER, S., HOLBL, A., GLEIXNER, K. V., DWORZAK, M., MAYERHOFER, M., HOERMANN, G., HERRMANN, H., SILLABER, C., EGGER, G., VALENT, P., MORIGGL, R. & SEXL, V. 2011. High STAT5 levels mediate imatinib resistance and indicate disease progression in chronic myeloid leukemia. *Blood*, 117, 3409-20.
- WEBER-NORDT, R. M., EGEN, C., WEHINGER, J., LUDWIG, W., GOUILLEUX-GRUART, V., MERTELSMANN, R. & FINKE, J. 1996. Constitutive activation of STAT proteins in primary lymphoid and myeloid leukemia cells and in Epstein-Barr virus (EBV)-related lymphoma cell lines. *Blood*, 88, 809-16.
- WERNIG, G., KHARAS, M. G., OKABE, R., MOORE, S. A., LEEMAN, D. S., CULLEN, D. E., GOZO, M., MCDOWELL, E. P., LEVINE, R. L., DOUKAS, J., MAK, C. C., NORONHA, G., MARTIN, M., KO, Y. D., LEE, B. H., SOLL, R. M., TEFFERI, A., HOOD, J. D. & GILLILAND, D. G. 2008. Efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in treatment of a murine model of JAK2V617F-induced polycythemia vera. *Cancer Cell*, 13, 311-20.
- WERNIG, G., MERCHER, T., OKABE, R., LEVINE, R. L., LEE, B. H. & GILLILAND, D. G. 2006. Expression of Jak2V617F causes a polycythemia vera-like disease with associated myelofibrosis in a murine bone marrow transplant model. *Blood*, 107, 4274-81.
- WERTHEIM, J. A., PERERA, S. A., HAMMER, D. A., REN, R., BOETTIGER, D. & PEAR, W. S. 2003. Localization of BCR-ABL to F-actin regulates cell adhesion but does not attenuate CML development. *Blood*, 102, 2220-8.
- WEST, K. 2009. CP-690550, a JAK3 inhibitor as an immunosuppressant for the treatment of rheumatoid arthritis, transplant rejection, psoriasis and other immune-mediated disorders. *Curr Opin Investig Drugs*, 10, 491-504.
- WETZLER, M., TALPAZ, M., VAN ETEN, R. A., HIRSH-GINSBERG, C., BERAN, M. & KURZROCK, R. 1993. Subcellular localization of Bcr, Abl, and Bcr-Abl proteins in normal and leukemic cells and correlation of expression with myeloid differentiation. *J Clin Invest*, 92, 1925-39.
- WETZLER, M., TALPAZ, M., YEE, G., STASS, S. A., VAN ETEN, R. A., ANDREEFF, M., GOODACRE, A. M., KLEINE, H. D., MAHADEVIA, R. K. & KURZROCK, R. 1995. Cell cycle-related shifts in subcellular localization of BCR: association with mitotic chromosomes and with heterochromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 3488-92.
- WILSON-RAWLS, J., XIE, S., LIU, J., LANEUVILLE, P. & ARLINGHAUS, R. B. 1996. P210 Bcr-Abl interacts with the interleukin 3 receptor beta(c) subunit and constitutively induces its tyrosine phosphorylation. *Cancer Res*, 56, 3426-30.
- WU, T. R., HONG, Y. K., WANG, X. D., LING, M. Y., DRAGOI, A. M., CHUNG, A. S., CAMPBELL, A. G., HAN, Z. Y., FENG, G. S. & CHIN, Y. E. 2002. SHP-2 is a

- dual-specificity phosphatase involved in Stat1 dephosphorylation at both tyrosine and serine residues in nuclei. *J Biol Chem*, 277, 47572-80.
- XIE, S., WANG, Y., LIU, J., SUN, T., WILSON, M. B., SMITHGALL, T. E. & ARLINGHAUS, R. B. 2001. Involvement of Jak2 tyrosine phosphorylation in Bcr-Abl transformation. *Oncogene*, 20, 6188-95.
- XU, Y., YIN, J., PAN, J., WU, C., WANG, Q., YAO, H., WU, D., CHEN, S. & SUN, A. 2013. A BCR-JAK2 fusion gene from ins(22;9)(q11;p13p24) in a patient with atypical chronic myeloid Leukemia. *Leuk Lymphoma*.
- YANG, J., IKEZOE, T., NISHIOKA, C., FURIHATA, M. & YOKOYAMA, A. 2010. AZ960, a novel Jak2 inhibitor, induces growth arrest and apoptosis in adult T-cell leukemia cells. *Mol Cancer Ther*, 9, 3386-95.
- YE, D., WOLFF, N., LI, L., ZHANG, S. & ILARIA, R. L., JR. 2006. STAT5 signaling is required for the efficient induction and maintenance of CML in mice. *Blood*, 107, 4917-25.
- YOSHIMURA, A., ICHIHARA, M., KINJYO, I., MORIYAMA, M., COPELAND, N. G., GILBERT, D. J., JENKINS, N. A., HARA, T. & MIYAJIMA, A. 1996. Mouse oncostatin M: an immediate early gene induced by multiple cytokines through the JAK-STAT5 pathway. *EMBO J*, 15, 1055-63.
- YU, C. L., MEYER, D. J., CAMPBELL, G. S., LARNER, A. C., CARTER-SU, C., SCHWARTZ, J. & JOVE, R. 1995. Enhanced DNA-binding activity of a Stat3-related protein in cells transformed by the Src oncoprotein. *Science*, 269, 81-3.
- YU, H. & JOVE, R. 2004. The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer*, 4, 97-105.
- ZALESKAS, V. M., KRAUSE, D. S., LAZARIDES, K., PATEL, N., HU, Y., LI, S. & VAN ETTEN, R. A. 2006. Molecular pathogenesis and therapy of polycythemia induced in mice by JAK2 V617F. *PLoS One*, 1, e18.
- ZHANG, J. G., FARLEY, A., NICHOLSON, S. E., WILLSON, T. A., ZUGARO, L. M., SIMPSON, R. J., MORITZ, R. L., CARY, D., RICHARDSON, R., HAUSMANN, G., KILE, B. J., KENT, S. B., ALEXANDER, W. S., METCALF, D., HILTON, D. J., NICOLA, N. A. & BACA, M. 1999. The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 2071-6.
- ZHANG, X. & REN, R. 1998. Bcr-Abl efficiently induces a myeloproliferative disease and production of excess interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in mice: a novel model for chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 92, 3829-40.
- ZHOU, Y., ARAN, J., GOTTESMAN, M. M. & PASTAN, I. 1998. Co-expression of human adenosine deaminase and multidrug resistance using a bicistronic retroviral vector. *Hum Gene Ther*, 9, 287-93.

ANEXO I

Publicaciones relacionadas con la memoria de Tesis Doctoral

Transforming and Tumorigenic Activity of JAK2 by Fusion to BCR: Molecular Mechanisms of Action of a Novel BCR-JAK2 Tyrosine-Kinase

Álvaro Cuesta-Domínguez¹*, Mara Ortega¹, Cristina Ormazábal², Matilde Santos-Roncero¹, Marta Galán-Díez¹, Juan Luis Steegmann³, Ángela Figuera³, Eva Arranz³, José Luis Vizmanos², Juan A. Bueren⁴, Paula Río⁴, Elena Fernández-Ruiz^{1*}

1 Molecular Biology Unit, Hospital Universitario de la Princesa, Instituto de Investigación Sanitaria Princesa (IP) and Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), Madrid, Spain, **2** Department of Genetics, University of Navarra, Pamplona, Spain, **3** Department of Hematology, Hospital Universitario de la Princesa, Madrid, Spain, **4** Division of Hematopoiesis and Gene Therapy, Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT) and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid, Spain

Abstract

Chromosomal translocations in tumors frequently produce fusion genes coding for chimeric proteins with a key role in oncogenesis. Recent reports described a *BCR-JAK2* fusion gene in fatal chronic and acute myeloid leukemia, but the functional behavior of the chimeric protein remains uncharacterized. We used fluorescence *in situ* hybridization and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) assays to describe a *BCR-JAK2* fusion gene from a patient with acute lymphoblastic leukemia. The patient has been in complete remission for six years following treatment and autologous transplantation, and minimal residual disease was monitored by real-time RT-PCR. *BCR-JAK2* codes for a protein containing the BCR oligomerization domain fused to the JAK2 tyrosine-kinase domain. *In vitro* analysis of transfected cells showed that BCR-JAK2 is located in the cytoplasm. Transduction of hematopoietic Ba/F3 cells with retroviral vectors carrying *BCR-JAK2* induced IL-3-independent cell growth, constitutive activation of the chimeric protein as well as STAT5 phosphorylation and translocation to the nuclei, where *Bcl-xL* gene expression was elicited. Primary mouse progenitor cells transduced with *BCR-JAK2* also showed increased proliferation and survival. Treatment with the JAK2 inhibitor TG101209 abrogated BCR-JAK2 and STAT5 phosphorylation, decreased *Bcl-xL* expression and triggered apoptosis of transformed Ba/F3 cells. Therefore, BCR-JAK2 is a novel tyrosine-kinase with transforming activity. It deregulates growth factor-dependent proliferation and cell survival, which can be abrogated by the TG101209 inhibitor. Moreover, transformed Ba/F3 cells developed tumors when injected subcutaneously into nude mice, thus proving the tumorigenic capacity of BCR-JAK2 *in vivo*. Together these findings suggest that adult and pediatric patients with *BCR-ABL*-negative leukemia and *JAK2* overexpression may benefit from targeted therapies.

Citation: Cuesta-Domínguez Á, Ortega M, Ormazábal C, Santos-Roncero M, Galán-Díez M, et al. (2012) Transforming and Tumorigenic Activity of JAK2 by Fusion to BCR: Molecular Mechanisms of Action of a Novel BCR-JAK2 Tyrosine-Kinase. PLoS ONE 7(2): e32451. doi:10.1371/journal.pone.0032451

Editor: Kevin D. Bunting, Emory University, United States of America

Received: January 12, 2011; **Accepted:** January 30, 2012; **Published:** February 27, 2012

Copyright: © 2012 Cuesta-Domínguez et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was partially supported by grants from Fundación Mutua Madrileña and Ministerio de Ciencia e Innovación (MIIICIN), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) PI05/1999 and PI08/1772 awarded to E.F.-R., PI04/0037 and SAF2007-62473 awarded to J.L.V., and CIBERER and Fundación Marcelino Botín awarded to J.A.B. and P.R. A.C.-D. was supported by ISCIII co-financed by European Development Regional Fund "A way to achieve Europe", Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI RD07/0008/2006 awarded to E.F.-R.), and M.G.-D. by Consejería de Educación de la Comunidad de Madrid and Fondo Social Europeo (FSE). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: efernandez.hlpr@salud.madrid.org

† These authors contributed equally to this work.

Introduction

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a malignant disease characterized by the clonal expansion of lymphoid progenitors. Outcome is poorer in adults than in children, probably due to the higher frequency of Philadelphia (Ph⁺) chromosome-positive ALL [1]. The Ph⁺ chromosome results from a translocation, t(9;22)(q34;q11), which leads to the *BCR-ABL* fusion gene. One-third of adult ALL patients with the Ph⁺ chromosome show major (M)-BCR rearrangements (resulting in a 210-kDa protein), whereas two-thirds have minor (m)-BCR rearrangements (resulting in a 190-kDa protein). These chimeric proteins are hyperactive tyrosine kinases

(TK) that are located in the cytoplasm, where they recruit downstream effectors of cell proliferation and survival. Chromosomal rearrangements other than t(9;22)(q34;q11) are found in ALL, although they are less frequent (<http://AtlasGeneticsOncology.org>).

JAK2 is a non-receptor TK protein that is essential for signaling through a variety of cytokine receptors and is required for normal hematopoiesis [2,3]. Activation of the JAK2-cytokine receptor complex leads to the recruitment and JAK2-mediated phosphorylation of STAT5 proteins whose subsequent dimerization and nuclear translocation induces target gene transcription [4]. The role of constitutively activated JAK2 or STAT5 in cellular transformation has been established [5]. Several fusion proteins

involving the catalytic active JH1 domain of JAK2 have been reported to be associated with leukemia, as follows: 1) TEL-JAK2 was found in both pre-B-lineage and pre-T-lineage ALL and atypical chronic myelogenous leukemia (CML) [6,7] 2) *PCM1-JAK2* gene fusion resulting from t(8;9)(p22;p24) in eosinophilia-associated atypical CML, ALL, acute myeloid leukemia (AML), and T cell lymphoma [8], and 3) *BCR-JAK2* gene fusion as the result of t(9;22)(p24;q11) was found in atypical CML [9,10] and AML [11]. Other putative JAK2 translocations include *SSBP2-JAK2* in pre-B ALL [12], *PAX5-* and *STRN3-JAK2* in childhood ALL [13] and *SEC31A-JAK2* in classical non Hodgkin lymphoma [14]. Moreover, gain-of-function JAK2 mutations are common in myeloproliferative neoplasms [15] and in up to 15% of adult and high-risk pediatric B-ALL lacking *MLL*, *TCF3*, *TEL* and *BCR-ABL* rearrangements [16,17,18]. These observations have supported the search for selective inhibitors of JAK2 [19,20] and several compounds are currently undergoing clinical trials for myelofibrosis [21,22]. Here we provide for the first time evidence of the transforming and tumorigenic activity of JAK2 through fusion with BCR.

Materials and Methods

Ethics Statement

Patient written informed consent was obtained before bone marrow biopsies were taken. This protocol was carried out according to current Spanish legislation on clinical research in humans and was approved by the Hospital Universitario de la Princesa Clinical Investigation Ethics Committee (Approval ID: PI-424).

All experimentation with mice was carried out in accordance with institutional guidelines from the animal care and use committee from Centro de Investigaciones Tecnológicas y Medioambientales (CIEMAT) and approved by them with approval ID: HEM 4-09.

Case description

A 58-year-old male presented with asthenia, abdominal pain and slight hepatosplenomegaly. The blood count was abnormal with anemia of Hb 10.9 g/dl and a platelet count of $41 \times 10^3/\text{mm}^3$. The white blood cell count was $10.8 \times 10^3/\text{mm}^3$ with 38% lymphocytes, 6% monocytes, 4% myelocytes and metamyelocytes, and 58% small lymphoblasts. Immunophenotyping of bone marrow disclosed B-lineage lymphoblasts (CD34⁺, CD19⁺, CD10⁺, MPO⁻, CD79a⁺, HLA-DR⁺, Tdt⁺, CD22⁺, and CD24⁺). Karyotyping performed on the marrow aspirate revealed 49,XY,+X,+2,+4,-9,-11,+19,-add(19)(q13),+20,-22,+mar in 24 of 25 metaphases examined. *BCR-ABL* and *MLL* rearrangements were not detected by standard fluorescence *in situ* hybridization (FISH). While reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) analyses for *BCR-ABL* rearrangements were negative, we found a new *BCR-JAK2* transcript. The patient was diagnosed with ALL and started a standard high-risk ALL protocol. Hematologic, cytogenetic, and complete molecular remission (CMR) was achieved after five weeks, and the treatment proceeded through four standard consolidation cycles followed by an autologous peripheral blood stem cell transplant (SCT) with cyclophosphamide and total body irradiation (12 Gy). Low-dose interferon alpha was administered for five months as maintenance antileukemia therapy. More than six years later, the patient remains in complete remission.

RT-PCR and real-time PCR

Total RNA was isolated using Ultraspec (Biotecx, Houston, TX, USA) and reverse transcribed using the GeneAmp Gold RNA PCR Core Kit (Applied Biosystems, Cheshire, UK). PCR for BCR-ABL p190 was carried out according to [23]. BCR-B

and JAK2-3 primers were used for *BCR-JAK2* qualitative PCR (Table 1). Long-range PCR to amplify full-length *BCR-JAK2* cDNA was performed using the GC-RICH PCR System (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) with BCR-Fw-T and JAK2-Rv-T primers. The PCR product was cloned in PCR2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and sequenced using the d-rhodamine terminator cycle sequencing kit and an ABI PRISM 337 DNA sequencer (Applied-Biosystems). Sequences were aligned using BLAST and ClustalW applications (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/>). *BCR-JAK2* was quantified using fluorescence resonance energy transfer (FRET)-hybridization probes designed by TibMolbiol (Berlin, Germany) and hybridized to a *BCR* sequence upstream of the *BCR-JAK2* breakpoint by means of BCR-B and JAK2-3 primers. The PCR master mix was prepared with 0.3 μM of each primer and probe using LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe (Roche Diagnostics), and the reaction was performed in duplicate on a LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics). Data were normalized using *BCR* levels in the same samples. Quantitative PCR (qPCR) for *Bcl-xL*, *Osm* was performed using the LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I kit (Roche Diagnostics) and *Socs2* (NM_007706) expression was analysed using RT² qPCR primer assay (SABiosciences, Frederick, MD, USA) following the manufacturer's protocols. Data were normalized using *H3* (patient sample) or *Gapdh* (Ba/F3 cells) levels.

Fluorescence *in situ* hybridization

FISH was performed on bone marrow interphase nuclei using a probe set for *BCR* (LSI[®] 22 BCR Spectrum GreenTM; Vysis, Downers Grove, IL, USA) and bacterial artificial chromosome (BAC) clone flanking probes covering the whole *JAK2* gene (see probe's names and locations in Figure 1, E–G). *JAK2* clone positions were based on data provided by the University of California–Santa Cruz Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu>) version hg18 (March 2006). BAC clones were obtained from the BACPAC Resource Center at the Children's Hospital (Oakland, CA, USA) and from the Sanger Institute Mapping Core Group at The Wellcome Trust Sanger Institute (Hinxton, United Kingdom) (<http://cancerres.aacrjournals.org>). BAC DNA was isolated from 5-ml cultures using a standard miniprep procedure (PhasePrepTM BAC DNA Kit, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and labelled by nick translation with Spectrum-Green-dUTP and SpectrumOrange-dUTP (Vysis). FISH was performed according to standard procedures. In all experiments, 100–150 interphase nuclei were scored, and no metaphases were observed.

Cell lines and reagents

HEK293T cells (ATCC) were cultured in DMEM (Cambrex, East Rutherford, NJ, USA) containing 10% fetal calf serum, 100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamicin and 4 mM L-glutamine at 37°C and 5% CO₂. Murine Ba/F3 pro-B cells (ATCC) were grown in DMEM with 10 ng/ml of recombinant IL-3 (R&D, Minneapolis, MN, USA). Cytokine-independent Ba/F3 cells transduced with *TEL-JAK2* were a gift from Dr. G. Reuther (Florida University, Tampa, USA). JAK2 inhibitor TG101209 was provided by Dr. Fuller (TargeGen Inc., San Diego, CA, USA). Stock solutions were prepared in dimethylsulfoxide (DMSO).

DNA constructs and retroviral vectors

For expression in HEK293T cells, *BCR-JAK2* cDNA was sub-cloned into the expression vector pcDNA3.1 (Invitrogen) through an *EcoR* I site. For retroviral infections in Ba/F3 cells, cDNA was cloned

Table 1. Primers and probes used for PCR analysis.

PCR	Gene sequence	Name	5' - 3'	Annealing temperature (°C)	Cycles	Product size (bp)	Position (nt)
Qualitative	<i>BCR-JAK2</i>	BCR-Fw-T	GCCATGGTGACCCCGGTGG	55	35	2260	594–612 ¹
		JAK2-Rv-T	AAGGTCAATTTCTTCATCCAGCC				3884–3906 ²
Quantitative	<i>BCR-JAK2</i>	FRET-probe-FL	GTCTTGGCGACGCCACGA-FL *	63	45	997	1211–1229 ¹
		FRET-probe-LC640	LC640-GGTGGCTCGGACACGACAACC+				1188–1209 ¹
	<i>BCR</i>	BCR-B-Fw	CCCCCGGAGTTTGAGGATTG	63	45	301	1547–1567 ¹
		JAK2-3-Rv	GGCCACAGAAAACCTGCTCTC				3576–3596 ²
	<i>Bcl-xL</i>	BCR-B-Fw	CCCCCGGAGTTTGAGGATTG	58	45	187	1547–1567 ¹
		BCR-B-Rv	ATCGTTGGGCCAGATCTGCC				1828–1847 ¹
	<i>Osm</i>	Bcl-xL Fw	TCAGAGCTTTGAGCAGGTAGTG	58	45	74	726–747 ³ 552–573 ⁴
		Bcl-xL Rv	TCCCGTAGAGATCCACAAAAG				935–955 ³ 761–781 ⁴
	<i>Gapdh</i>	Osm Fw	AGAATCAGGCGAACCTCACGG	58	45	116	217–237 ⁵
		Osm Rv	GTGTGTTCAAGTTTGGAGGC				271–291 ⁵
	<i>H3</i>	Gapdh Fw	AGAAGGTGTTGAAGCAGGCATC	62	35	201	820–841 ⁶
		Gapdh Rv	CGGCATCGAAGGTGGAAGAGTG				915–936 ⁶
		H3 Fw	AAAGCCGCTCGCAAGAGTGCG				185–205 ⁷
		H3 Rv	ACTTGCCCTCTGCAAAGCAC				387–406 ⁷

Fw, forward; Rv, reverse; FL, fluorescein; LC640, LightCycler Red.

*,+: inverse and complementary probe sequences to human *BCR*;

¹human *BCR* (NM_004327);

²human *JAK2* (NM_004972);

³human *Bcl-xL* (*BCLXL* or *BCL2L1*) (NM_1385781);

⁴mouse *Bcl-xL* (*BCL2-like 1* or *Bcl2l1*) (NM_009743) and

⁵mouse *Osm* (oncostatin M) (NM_001013365.2) [39];

⁶mouse *Gapdh* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) NM_008084.2;

⁷human *H3* (*H3F3A*) (NM_002107.3).

Primers for *Bcl-xL* and *H3F3A* are designed to hybridize with both human and mouse sequences (patient samples and Ba/F3 cells, respectively).

doi:10.1371/journal.pone.0032451.t001

into the *EcoR* I site of the pLZR CMV-IRES-EGFP (pLZR) vector (Dr. Bernad, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid, Spain) to obtain the pLZR-BJ-IRES-EGFP (pLZR-BJ) vector. The pLZR vector was used as a control. All constructs were verified by DNA sequencing.

Cell transfections, retrovirus production, infection, and proliferative assays

Transient transfections in HEK293T cells were performed with 3 µg of plasmid in Opti-MEM (Lonza, Basel, Switzerland) using Lipofectin (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions and analyzed 48 h later. For Ba/F3 cell infection, retroviral supernatants were obtained as previously described [24] after transient transfection of Nxe cells with 10 µg of the pLZR vector bearing or not *BCR-JAK2*. At 24 and 48 h post-transfection, viral supernatants were harvested, filtered, and stored at −80°C. Ba/F3 cells were infected with retroviral supernatants preloaded four times during 30 min in Retronectin (12.5 mg/ml, Takara Bio Inc., Shiga, Japan)-coated plates. After 7 days, EGFP+ cells were sorted by flow cytometry using a FACSAria cytometer (Becton-Dickinson, Franklin Lanes, NJ, USA). For proliferative assays, 3 × 10⁵ cells of Ba/F3-mock or Ba/F3-BJ cells were cultured with or without IL-3 (10 ng/ml) on 24-well plates and counted daily by trypan blue exclusion. TG101209 dose-dependent kinetic assays were performed as described [19]. Lineage negative (Lin-) progenitor cells were selected from male Balb/c mice. Total bone marrow cells obtained by perfusion of tibiae and femur with IMDM medium

(Invitrogen) were counted and negatively selected by MACS Lineage Cell Depletion Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) following manufacturer instructions. Lin- cells were prestimulated during 48 h (100 ng/µl mSCF, 100 ng/µl hIL-11) as previously described [25] and seeded in retromectin-coated 6-well plates for retroviral transduction either with pLZR (mock) or pLZR-BJ particles. Two cycles of retroviral transduction with a multiplicity of infection of 50 virus/cell were conducted, and cells were finally washed and seeded in 6-well plates at 5 × 10⁴ cells/ml for in vitro expansion. Cells were counted by trypan blue exclusion every week during 30 days.

Immunofluorescence

See Methods S1.

Western blot analysis

Cells were treated with lysis buffer (0.1 M Tris pH 8, 0.3 M NaCl, 2% NP-40, 1X EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail and 1X PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail [Roche]). Whole cell lysates (50 µg) or anti-phosphotyrosine immunoprecipitates (pTyr, BD Biosciences) (500 µg) were resolved by SDS-PAGE under reducing conditions and blotted with the following antibodies (Ab's): anti-JAK2, anti-p-STAT5 (Cell Signaling, Beverly, CA, USA), anti-STAT5, anti- IκBα (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-Bcl-xL (BD Biosciences), anti-tubulin (Sigma-Aldrich), anti-TBP (Abcam, Cambridge, UK) and secondary HRP-conjugated anti-mouse/anti-rabbit antibodies (GE Healthcare, Bucks, UK). Enriched nuclear

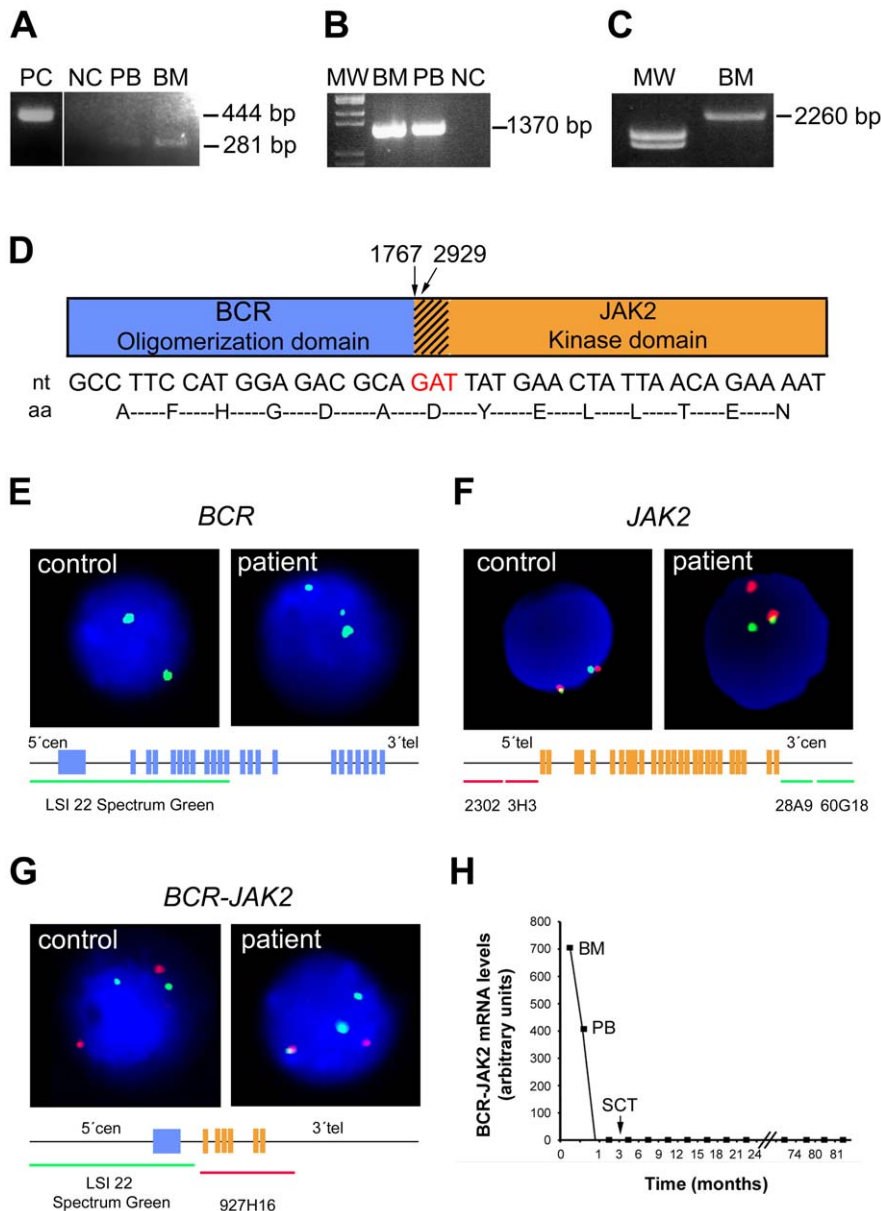


Figure 1. Cloning and identification of BCR-JAK2 fusion gene. (a) Nested RT-PCR analysis with standard primers for p190 *BCR-ABL* amplification (BCR-B and ABL3) on the ALL patient's samples at diagnosis (PB, peripheral blood; BM, bone marrow) showing an unexpected PCR product of 281 bp. PC: positive control (BCR-ABL⁺ p190); NC, healthy negative control. (b) Verification of the *BCR-JAK2* fusion gene by RT-PCR analysis using primers for *BCR* (BCR-B) and for the region flanking the stop codon of *JAK2* (JAK2-Rv-T). NC, BCR-ABL⁺ p210; MW, molecular weight marker. The 1,370-bp product contains part of *BCR* exon 1 fused to exon 19 of *JAK2* tyrosine-kinase. (c) Full-length *BCR-JAK2* cDNA amplification. RT-PCR with primers extending the start codon of *BCR* and the stop codon of *JAK2*. (d) Schematic diagram of the putative BCR-JAK2 fusion protein (strips represent the fragment of the JAK2 domain JH2). Nucleotide (nt) and amino acid (aa) sequences below showed the *BCR-JAK2* breakpoint region (red lettering represents the common *BCR* and *JAK2* triplet). Numbers indicate the nucleotide breakpoint position: 1767 for the *BCR* gene (NM_004327) and 2929 for *JAK2* (NM_004972). (e) Interphase nuclei of bone marrow cells at diagnosis after FISH analysis with a probe extending the 5' region of *BCR*, showing three green signals indicating a translocation affecting one *BCR* allele. Schematic *BCR* gene structure and probe localization are represented below the nuclei. (f) FISH analysis with BAC probes flanking *JAK2*. Co-localized green and red signals correspond to the normal *JAK2* copy. Rearranged *JAK2* allele is detected in the patient's nucleus as single green and red signals. (g) FISH analysis for *BCR-JAK2* translocation. Two *BCR* (green) and two *JAK2* (red) signals were observed in the control, whereas three *BCR* signals were detected in the patient, one of them fused with one red signal, revealing fusion between *BCR* and *JAK2*. (h) *BCR-JAK2* qPCR. Specific FRET-hybridization probes were used. Arbitrary values for *BCR-JAK2* transcripts from diagnosis up to the present time are represented. Data were normalized with *BCR*. Molecular response was achieved before SCT. BM, bone marrow; PB, peripheral blood.

doi:10.1371/journal.pone.0032451.g001

and cytoplasmic extracts were obtained using an NE-PER extraction reagents kit (Thermo Scientific, Rockford, IL) after 10 min of cold hypotonic shock in 10 mM NaCl. Western blots

were visualized using SuperSignal West Pico Chemiluminescent Reagent (Thermo Scientific). Densitometry was performed using Image-Gauge v3.46 software (FujiFilm, Tokyo, Japan).

Luciferase reporter assay

See Methods S1.

Apoptosis analysis by flow cytometry

Apoptosis was measured by the binding of Annexin-V and the incorporation of 7-amino-actinomycin D (7-AAD) after treatment with the inhibitors. Cells were washed twice with cold PBS and then resuspended in 1X Binding Buffer (BD Biosciences) at a concentration of 1×10^6 cells/ml. Staining with annexin V-phycoerythrin (PE) and 7-AAD was performed following the manufacturer's instructions (BD Biosciences). Samples were analyzed through flow cytometry using an EPICS XL cytometer (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA).

Tumorigenicity assays in nude mice

Ten female BALB/c OlaHsd-Foxn1^{nu/nu} mice (Harlan Laboratories Inc., Indianapolis, IN, USA) were subcutaneously injected with 10^7 Ba/F3 cells expressing BCR-JAK2 together with EGFP (right flank) and 10^7 Ba/F3-mock cells expressing only EGFP (left flank). Mice were examined by palpation for tumor formation for up to 20 days and then sacrificed by cervical dislocation and analyzed in a 2000-MM Image Station (Kodak, Rochester, NY, USA) to detect an EGFP signal. Tumors were extracted and disaggregated with 20 μ g/ml of collagenase IMDM (Sigma-Aldrich) for 4 h prior to RNA extraction or flow cytometry analysis in an EPICS XL (Beckman Coulter).

Results

BCR-JAK2 fusion gene identification and real-time PCR analysis for minimal residual disease follow-up

Standard RT-PCR was performed to detect *BCR-ABL* using RNA from bone marrow and peripheral blood samples at diagnosis. The result for the M-*BCR-ABL* breakpoint region was negative (data not shown), but for m-*BCR-ABL* the reaction revealed a smaller product compared with the positive control (Figure 1A). Sequence analysis revealed that this in-frame product corresponded to the expected *BCR* exon 1 region, which is usually found in the p190 *BCR-ABL* transcript fused to 90 bp corresponding to *JAK2* exon 19 and flanked by the *ABL* reverse primer (ABL3) (Figure S1). In line with the results of recent cases of CML [9,10] and AML [11], these data suggested the presence of a *BCR-JAK2* fusion gene. RT-PCR assays were performed on the same samples (Figure 1B) with primers for BCR (BCR-B) and the stop codon of JAK2 (JAK2-Rv-T, see Table 1). A specific band of 1,307 bp was obtained and sequenced, containing BCR and the TK domain of JAK2. The full-length *BCR-JAK2* cDNA was amplified using primers flanking the start codon of *BCR* (BCR-Fw-T) and the stop codon of *JAK2* (JAK2-Rv-T). A specific band of 2,260-bp was obtained (Figure 1C), sequenced and subcloned. The complete cDNA encoded a putative 749 amino acid polypeptide with a predicted molecular mass of 83 kDa that contained the N-terminal coiled-coil domain of *BCR* followed by the TK domain of *JAK2* (JH1) (Figure 1D).

An additional FISH analysis was performed (Figure 1E–G). Using a 300-kb green probe extending the 5' *BCR* gene region, 3 signals were detected in 73 of 100 nuclei scored, suggesting that one *BCR* allele is broken (Figure 1E). In addition, when specific 5' red and 3' green *JAK2* flanking probes were used, three signals were observed in 62 of 101 nuclei scored: one co-localized green-red signal corresponding to the normal gene copy, and one red signal and one green signal, suggesting a breakpoint within the *JAK2* locus (Figure 1F). Finally, hybridization with a green probe for *BCR* and a red probe for *JAK2* showed three green and two red

signals. One of the green split signals was fused with one red signal, revealing a fusion between the *BCR* and *JAK2* genes in 62 out of 150 (41.3%) nuclei scored (Figure 1G). A specific *BCR-JAK2* real-time PCR assay was designed for follow-up of minimal residual disease (MRD). The patient acquired CMR five weeks after induction therapy and prior to SCT, and CMR was maintained to the present time (more than six years) (Figure 1H).

Ectopic expression of BCR-JAK2 renders hematopoietic cells growth factor-independent

To investigate the transforming potential of BCR-JAK2, the interleukin-3 (IL-3)-dependent Ba/F3 cell line was used as a model [26] and transduced with the pLZR-IRES-EGFP retroviral vector containing *BCR-JAK2* cDNA (Ba/F3-BCR-JAK2) or the control vector (Ba/F3-mock). As a consequence of BCR-JAK2 expression, IL-3-independent Ba/F3 cells were obtained after 2–4 days of culture, yet no independent cells were obtained with the control vector. Interestingly, Ba/F3-BCR-JAK2 cells showed a cluster-forming growth pattern when compared to Ba/F3-mock cells (Figure 2A). Proliferative assays were developed with Ba/F3-BCR-JAK2 and Ba/F3-mock cells growing either in the presence or absence of IL-3 (Figure 2B). Ba/F3-BCR-JAK2 cells proliferated at a comparable rate in both conditions and this rate was even higher than Ba/F3-mock cells growing with IL-3. Cytokine-independent Ba/F3 cells transduced with *TEL-JAK2* were used as a positive control because of its in vitro transforming ability [27,28]. These data suggest that BCR-JAK2 conferred a proliferative advantage and transformed hematopoietic cells in a

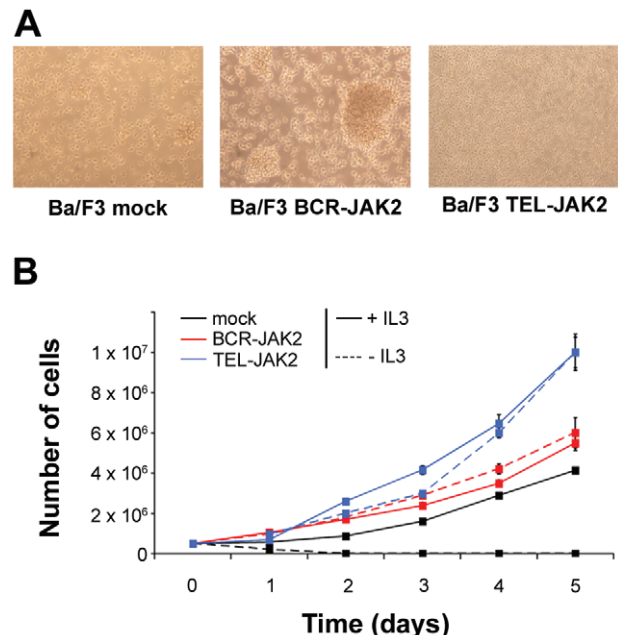


Figure 2. BCR-JAK2 renders Ba/F3 cells growth factor-independent. Ba/F3 cells were transduced in three independent experiments with pLZR-IRES-EGFP (pLZR) retroviral vector alone (Ba/F3-mock) or pLZR carrying BCR-JAK2 (Ba/F3-BCR-JAK2). Ba/F3 cells transduced with TEL-JAK2 were used as positive control (Ba/F3-TEL-JAK2). (a) Microphotographs of cultured Ba/F3-mock growing with IL-3 and Ba/F3-BCR-JAK2 and Ba/F3-TEL-JAK2 cells without IL-3 ($\times 20$ magnification). (b) For proliferation assays, 3×10^5 cells were incubated in the presence or absence of 10 ng/ml IL-3 for 5 days. Viable cells were counted daily by trypan blue exclusion. Ba/F3-BCR-JAK2 cells proliferate either in the presence or absence of IL-3. Results are given as mean \pm SD ($n = 3$). doi:10.1371/journal.pone.0032451.g002

similar way to TEL-JAK2 and other BCR-TK chimeric proteins such as BCR-ABL, BCR-PDGFR α , or BCR-FGFR1 [29,30,31].

BCR-JAK2 is constitutively phosphorylated, triggering STAT5 activation which translocates to the nucleus and induces *target gene* expression on transduced Ba/F3 cells

To test whether Ba/F3 cells stably transduced with pLZR-BJ expressed tyrosine-phosphorylated BCR-JAK2 and activated STAT5, cellular lysates were immunoprecipitated with anti-pTyr Ab and immunoblotted with anti-JAK2 to detect pJAK2. A tyrosine-phosphorylated product of approximately 90 kDa corresponding to the chimeric protein was detected in Ba/F3-BCR-JAK2 cells, whereas no such product was seen in Ba/F3-mock cells (Figure 3A). Therefore, BCR-JAK2, as TEL-JAK2 [6], was expressed and constitutively phosphorylated on transduced cells. It is worth noting that TEL-JAK2 protein expression is higher than BCR-JAK2 in transduced-Ba/F3 cells and this could explain their higher growth rate depicted in figure 2B. To investigate whether BCR-JAK2 induced STAT5 activation, Western blot was

performed using anti-pSTAT5 and anti-STAT5 Ab's, revealing STAT5 phosphorylation in all Ba/F3 cells tested, with increased p-STAT5 levels in Ba/F3-mock cells growing with IL-3 and Ba/F3-BCR-JAK2 and -TEL-JAK2 transduced cells (Figure 3A). When enriched cytoplasmic and nuclear fractions from total cell lysates were isolated, pSTAT5 was detected in the enriched nuclear fraction of these three cell types, suggesting functional STAT5 activation (Figure 3B). To investigate the subcellular localization of BCR-JAK2, transiently transfected HEK293T cells were analyzed by immunofluorescence with anti-JAK2 Ab. No signal was detected on HEK293T-mock cells, whereas HEK293T-BCR-JAK2 transfected cells showed intense staining for JAK2 in the cytoplasm (Figure S2). Taken together, these results suggest that BCR-JAK2 is located in the cytoplasm and induces cytokine-independent STAT5 phosphorylation and translocation into the nucleus.

To demonstrate STAT5 biological activity, qPCR of *Bcl-xL* gene expression was performed on transduced Ba/F3 cells (Figure 3C), given its upregulation upon STAT5 activation in

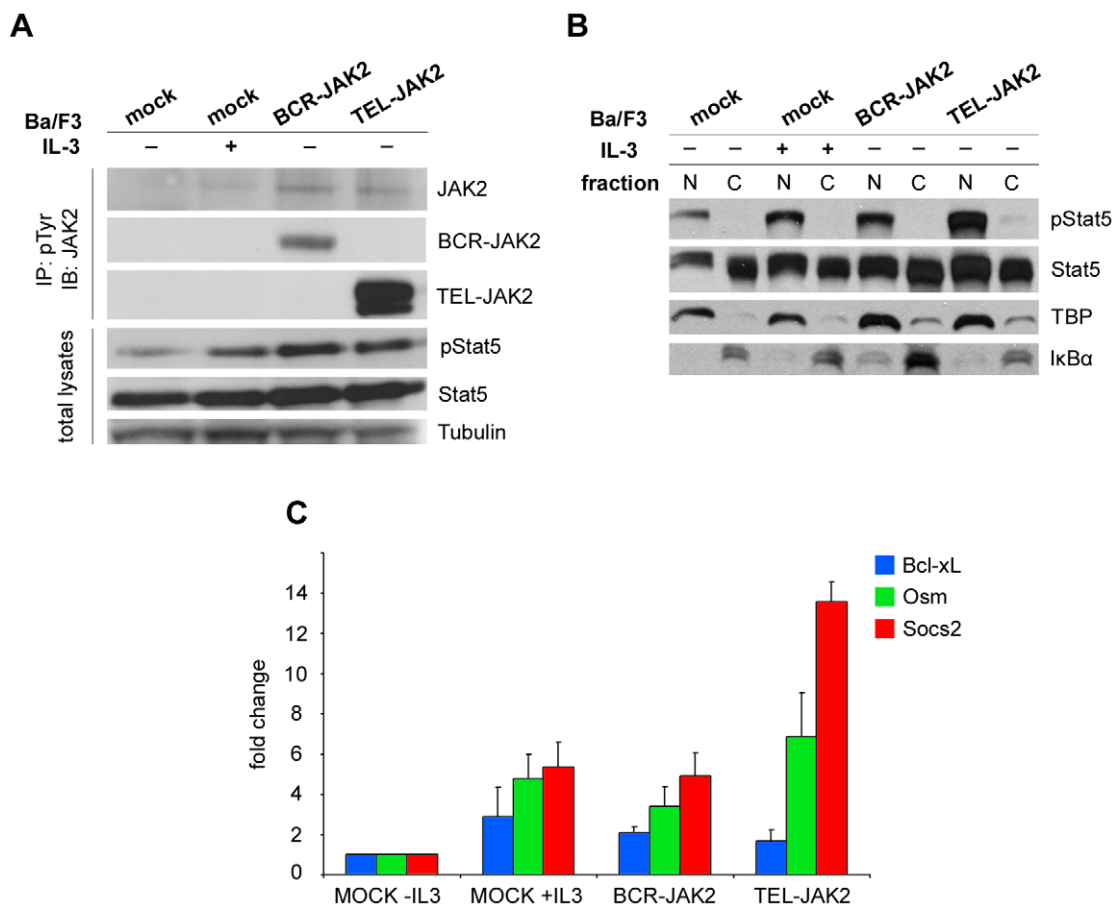


Figure 3. BCR-JAK2 is constitutively phosphorylated, triggering STAT5 activation which translocates to the nucleus and induces STAT5 target gene expression on transduced Ba/F3 cells. (a) Western blot analysis of Ba/F3 cells infected with BCR-JAK2, TEL-JAK2 or vector alone (mock). Cellular lysates were immunoprecipitated with anti-pTyr Ab and immunoblotted with anti-JAK2 Ab to see pJAK2 (upper panel: endogenous JAK2: 130 kDa, BCR-JAK2: 90 kDa, TEL-JAK2: 72 kDa). TEL-JAK2 protein expression is higher than BCR-JAK2 in transduced Ba/F3 cells. Whole cell lysates were probed with anti-pSTAT5 and anti-STAT5 Ab's (bottom). The expression levels of Tubulin were used as a loading control. (b) Enriched cytoplasmic (C) and nuclear (N) extracts from Ba/F3-mock, Ba/F3-BCR-JAK2 and Ba/F3-TEL-JAK2 cells were prepared from total cell lysates and blotted with anti-pSTAT5 Ab. TATA-Binding protein (TBP) and I κ B α were used as loading controls for enriched nuclear and cytoplasmic fractions, respectively. (c) Expression of *Bcl-xL*, *Osm* and *Socs2* in Ba/F3-mock, Ba/F3-BCR-JAK2 and Ba/F3-TEL-JAK2 cells by qPCR. For comparative purposes, mRNA levels in untreated cells were normalized to 1. Bars represent fold changes of each gene normalized using *GADPH* levels. Results are given as mean \pm SEM (n = 3).

doi:10.1371/journal.pone.0032451.g003

response to cytokines [32,33,34] and leukemic fusion proteins [35,36]. Two to three-fold upregulation in *Bcl-xL* expression was detected in Ba/F3-BCR-JAK2 and Ba/F3-mock cells growing with IL-3 suggesting cytokine-independent BCR-JAK2-mediated upregulation of *Bcl-xL*. Moreover, the quantification of *Bcl-xL* using RNA from the patient sample at diagnosis revealed increased expression of this gene compared with samples in CMR (Figure S3). In addition, luciferase reporter assays in HEK293T-BJ cells co-transfected with a plasmid bearing the promoter region of *Bcl-xL* containing a STAT binding element showed that BCR-JAK2 induced *Bcl-xL* promoter activation (Figure S4). As expected, HEK293T-mock cells were unable to induce *Bcl-xL* activation, whereas HEK293T cells transfected with a constitutively active STAT5 construct showed enhanced *Bcl-xL* activation. Therefore, we conclude that BCR-JAK2 elicited *Bcl-xL* promoter activation.

In addition to *Bcl-xL* expression, we have investigated other STAT5 target genes as oncostatin M (*Osm*) and suppressor of cytokine signaling-2 (*Socs2*) [27,37,38,39] (Figure 3C). As expected, both genes had increased expression in Ba/F3-BCR-JAK2, TEL-JAK2 [27] and mock cells growing with IL-3.

TG101209 abrogated BCR-JAK2 activation and STAT5 phosphorylation leading to downregulation of STAT5 target gene transcription

TG101209 is a potent and selective inhibitor of JAK2 ($IC_{50} = 6$ nM) that induces cell cycle arrest and apoptosis in Ba/F3 cells expressing the JAK2V617F mutation ($IC_{50} = 170$ nM) and in JAK2V617F-expressing acute myeloid leukemia cells through the inhibition of pJAK2V617F and pSTAT5 [19]. Therefore, Ba/F3 cells expressing BCR-JAK2, TEL-JAK2 or Ba/F3-mock cells were treated with TG101209 for 12 h and compared with the vehicle DMSO-treated cells. To analyze cell viability, dose-dependent kinetic assays were performed and 1 μ M TG101209 dose was selected (Fig. 4A). Interestingly, this assay revealed a higher susceptibility of Ba/F3-BCR-JAK2 and Ba/F3-TEL-JAK2 cells to TG101209 compared with Ba/F3-JAK2V617F cells [19]. Cellular lysates were immunoprecipitated with anti-pTyr Ab and immunoblotted with anti-JAK2 to detect pJAK2 (Figure 4B, upper panel). Densitometry analysis revealed a 76% inhibition rate of BCR-JAK2 phosphorylation at 12 h of treatment compared to 10% inhibition of pTEL-JAK2 but this could be due to the higher TEL-JAK2 expression. Endogenous JAK2 phosphorylation was also inhibited, as previously described [19]. However, phosphorylation of endogenous JAK2 is not seen or inconsistently detected in Ba/F3-BCR-JAK2 cells as it has been on Ba/F3 cells transduced with TEL-JAK2 [27,28,40,41]. Whole cell lysates from the same experiment were used and probed with anti-pSTAT5 Ab to detect whether BCR-JAK2 inhibition impaired STAT5 activation (Figure 4A, lower panel). STAT5 phosphorylation on Ba/F3-BCR-JAK2, Ba/F3-TEL-JAK2 and IL-3-starved Ba/F3-mock cells was almost completely inhibited, whereas Ba/F3-mock cells growing with IL-3 showed 40% inhibition. *Bcl-xL* expression was inhibited by 40% on TG101209-treated Ba/F3-BCR-JAK2 cells whereas on Ba/F3-mock and Ba/F3-TEL-JAK2 cells this inhibition was lower. qPCR for *Bcl-xL*, *Osm* and *Socs2* transcript detection was performed on Ba/F3-mock, Ba/F3-BCR-JAK2 and Ba/F3-TEL-JAK2 cells treated with TG101209 for 12 h. (Figure 4C). Both treated BCR-JAK2 and TEL-JAK2-expressing cells showed inhibition of *Bcl-xL*, *Osm* and *Socs2* expression. Taken together, these data suggest that TG101209 inhibited STAT5 activation and STAT5-mediated induction of *Bcl-xL*, *Osm* and *Socs2* through inhibition of both chimeric proteins

in transduced Ba/F3 cells and inhibition of endogenous JAK2 in Ba/F3-mock cells growing with IL-3.

TG101209 induces Ba/F3-BCR-JAK2 cell death by apoptosis

To determine whether TG101209 inhibitor induced apoptosis of BCR-JAK2 and TEL-JAK2-expressing cells, as previously described for cell lines bearing the JAK2V167F mutation [19], Annexin-V binding assays were performed using flow cytometry (Figure 5A). Treatment of Ba/F3-BCR-JAK2 cells with TG101209 (1 μ M) for 24 h resulted in an increase of approximately 80% in Annexin-V/7-AAD-positive cells. As expected, TG101209 only showed a modest increase in apoptosis of Ba/F3 mock cells growing with IL-3 (Figure 5B), thus demonstrating that induction of apoptosis in Ba/F3-BCR-JAK2 cells was a consequence of BCR-JAK2 inhibition. The rate of apoptotic Ba/F3-TEL-JAK2-treated cells was slightly lower than Ba/F3-BCR-JAK2-treated cells in accordance with their reduced susceptibility to TG101209 (Figure 4A). This could be due to higher levels of TEL-JAK2 protein expression (Figures 3A and 4B).

Nude mice injected with Ba/F3 cells expressing BCR-JAK2 develop tumors

The oncogenic properties of leukemic fusion proteins have already been described in a nude mice model [42]. In order to assess the tumorigenic potential of BCR-JAK2, ten nude mice were subcutaneously injected on the right side above the hind legs with Ba/F3-BCR-JAK2 cells and on the left side with Ba/F3-mock cells. Three mice died of nonrelated events and the rest were analyzed 20 days later, when tumors were clearly observed on the right side in all of them (Figure 6A, left panel). As expected, none of the mice developed tumors on the left side where Ba/F3-mock cells were injected. Considering that cells expressing BCR-JAK2 also co-express EGFP, its expression was confirmed in all tumors using a digital photostation (Figure 6A, right panel). In contrast, no EGFP signal was detected in the flank injected with Ba/F3 mock cells. Tumors were disaggregated and cells were analyzed by flow cytometry, which rendered at least 50% EGFP-expressing cells (Figure 6B). EGFP-negative cells found in those samples could be host accessory tumor cells as connective, epithelial and endothelial cells, although methylation events downregulating EGFP expression on BCR-JAK2-bearing cells could not be excluded [43,44]. RT-PCR analysis on RNA isolated from three different tumors showed specific amplification of BCR-JAK2 in every case (Figure 6C). We therefore conclude that BCR-JAK2 conferred oncogenic properties to Ba/F3 cells.

Primary progenitor cells transduced with BCR-JAK2 show increased proliferation

To test whether mouse primary progenitor cells transduced with BCR-JAK2 have increased survival, transduction of lineage negative (Lin^{-}) cells selected from bone marrow of Balb/c mice was performed and in vitro expansion was carried out (Figure 7). Lin^{-} cells transduced with pLZR-BJ showed an increase in proliferation capacity compared to wild type or pLZR-mock transduced cells. In fact, Lin^{-} BCR-JAK2-transduced cells lasted longer than 3 months in vitro (data not shown) while proliferation of control samples decreased after 30 days in culture. These data suggest that besides the proliferative advantage and ability to transform hematopoietic cell lines (Figure 2), BCR-JAK2 increased survival of primary hematopoietic progenitor cells. These findings are in agreement with in vivo transforming abilities as previously described for other leukemogenic proteins [45,46].

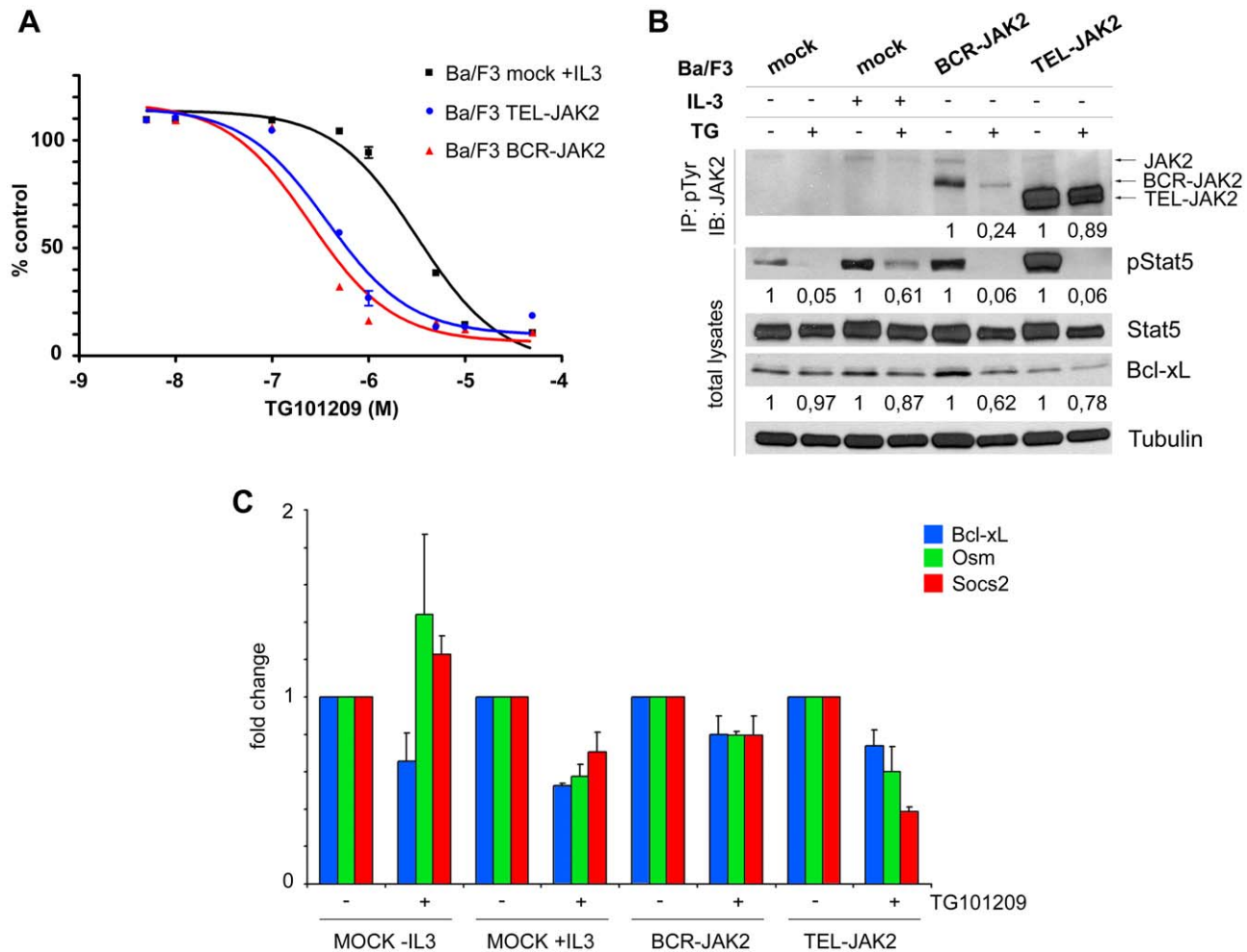


Figure 4. TG101209, a JAK2 inhibitor, down-regulates JAK2, BCR-JAK2, and STAT5 tyrosine-phosphorylation, as well as target gene expression of Ba/F3-BCR-JAK2 transduced cells. (a) Sigmoidal dose-response curve showing viability of Ba/F3-mock growing with IL-3 (IC_{50} = 3180 nM) and Ba/F3-BCR-JAK2 and Ba/F3-TEL-JAK2 growing in absence of IL-3 (IC_{50} = 246 and 369 nM, respectively). The percentage of growth, relative to that of cells in the absence of drug, is plotted for increasing concentrations of TG101209 (where X axis is the logarithm of concentration). (b) Western blot analysis of transduced Ba/F3 cells treated for 12 h with 1 μ M TG101209 (TG) or the vehicle (DMSO). Cellular lysates were immunoprecipitated with anti-pTyr Ab and immunoblotted with anti-JAK2 (upper panel). Whole cell lysates were probed with anti-pSTAT5, anti-STAT5 and anti-Bcl-xL Ab's (bottom). The expression levels of Tubulin were used as a loading control. STAT5 levels were used as a loading control for pSTAT5. (c) qPCR for *Bcl-xL*, *Osm* and *Socs2* expression on Ba/F3-mock, Ba/F3-BCR-JAK2 and Ba/F3-TEL-JAK2 cells treated for 12 h with 1 μ M TG101209. For comparative purposes, mRNA levels in untreated cells were normalized to 1. Bars represent fold changes of each gene after normalization with *GADPH* levels. Samples from three independent experiments were measured. Results are given as mean \pm SEM (n = 3). doi:10.1371/journal.pone.0032451.g004

Discussion

Two-thirds of adult patients with ALL do not have molecular markers associated with the disease; therefore, the search for new markers is an active area of research. We present the unique case of a patient suffering from ALL with a complex karyotype at diagnosis and harboring a *BCR-JAK2* fusion gene. Three additional studies report this translocation in leukemia patients. In contrast with the case presented here, the clinical diagnoses were found in atypical CML [9,10] and AML [11]. Our finding indicates that this translocation is not restricted to the myeloid lineage. Interestingly, in one of the CML-like cases, the breakpoints in *BCR* and *JAK2* were the same as in our case, whereas in the AML case the breakpoint in *BCR* was similar to that of p210 BCR/ABL and was in exon 11 for *JAK2*. Unlike our case, the patients in the cases mentioned above died after developing a blast crisis.

Specially designed qPCR to detect *BCR-JAK2* is a new tool for molecular diagnosis and follow-up of MRD. In the case presented here, persistence of undetectable MRD correlated with complete genetic and clinical response maintained to the present day. This could be due to the early molecular response achieved prior to SCT [47]. Further studies and more case report data are necessary to determine whether *BCR-JAK2*-positive myeloid/lymphoid neoplasms represent a distinct clinical-pathological entity.

The BCR-JAK2 protein contains the BCR coiled-coil domain fused to the JH1-tyrosine-kinase domain of JAK2. Native JAK2 in normal cells is phosphorylated by oligomerization of growth factor or cytokine receptors, whereas ligand-independent oligomerization of receptor and non-receptor TK in leukemias and solid tumors have been reported [15]. Therefore, in BCR-JAK2, it could be hypothesized that the kinase domain of JAK2 was activated through oligomerization mediated by the coiled-coil domain of BCR, as occurred in the constitutive activation of BCR-ABL [48].

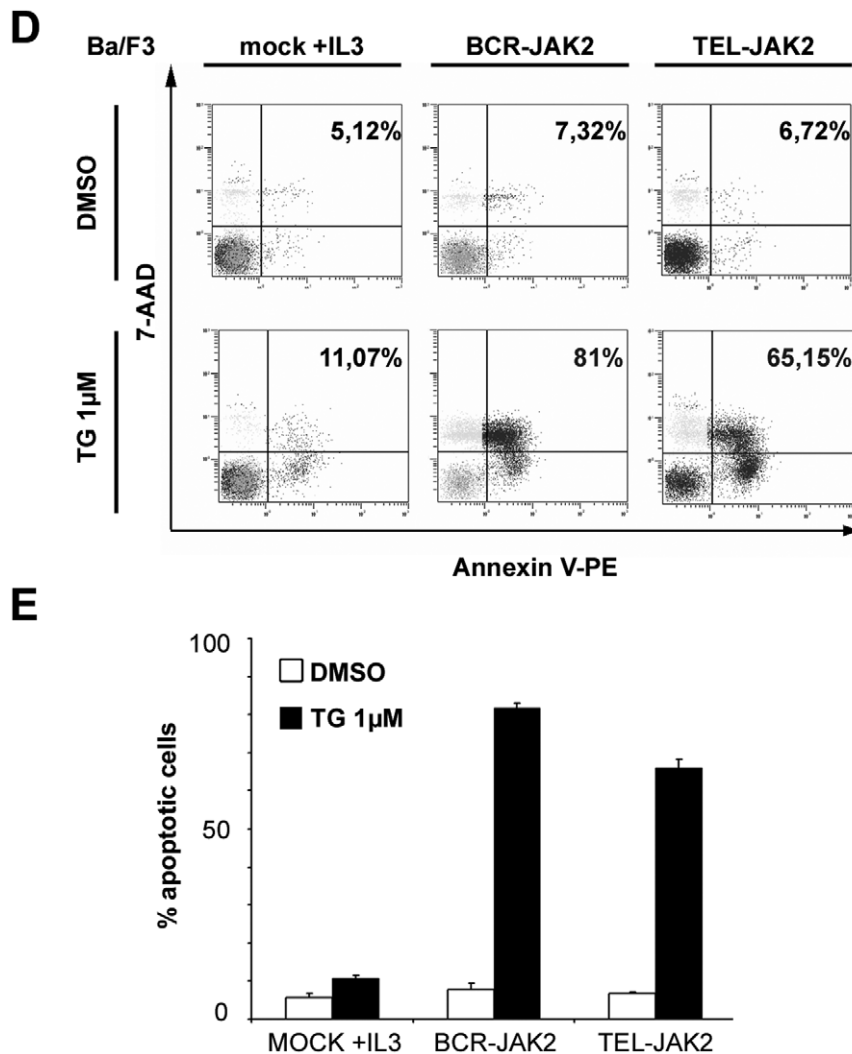


Figure 5. TG101209 induces apoptosis of Ba/F3-BCR-JAK2 cells. Ba/F3-mock growing with IL-3, Ba/F3-BCR-JAK2 and Ba/F3-TEL-JAK2 cells (10^5 /ml) were grown in 24-well plates and treated either with DMSO or 1 μ M TG101209 (TG) for 24 h. Ba/F3-mock cells growing for 24 h without IL-3 were dead (data not shown). Apoptosis was measured using flow cytometry analysis as the percentage of cells expressing annexin-V/7-AAD on the cell surface. (a) One representative experiment out of three is shown. (b) Quantification of apoptotic cells. Results are given as mean \pm SEM ($n = 3$). doi:10.1371/journal.pone.0032451.g005

Here, we report that Ba/F3 cells transformed to growth factor-independence by BCR-JAK2 showed STAT5 phosphorylation and translocation into the nucleus. These findings are consistent with the reported activation of the JAK-STAT pathway in transformed BCR-ABL and TEL-JAK2 cells, suggesting an essential role for STAT5 in both cellular transformation and maintenance of disease by TK fusion proteins or the Abelson virus [49,50,51]. In normal hematopoietic cells, STAT5 is activated by a wide variety of cytokines that promote differentiation, proliferation, and suppression of apoptosis by regulating expression or phosphorylation of *Bcl-2* gene family members [32]. The anti-apoptotic effect mediated by STAT5 activation in hematopoietic progenitors is partially based on the transcriptional regulation of *Bcl-xL* gene expression in response to IL-3 [33] and to BCR-ABL in transformed cells [35,36]. Consistent with this, we found *Bcl-xL* expression on Ba/F3-BCR-JAK2 cells in the absence of growth factor, suggesting that the JAK2/STAT5/*Bcl-xL* pathway could be responsible for Ba/F3-BCR-JAK2 cell proliferation and survival. However, we cannot exclude the participation of the BCR moiety in these activation processes

[52,53]. Further studies to evaluate whether different partners could modify the chimeric protein behaviour through specific downstream signal transduction effectors would thus be of interest. It is worth noting that *Bcl-xL* expression was enhanced in the patient samples at diagnosis compared with those taken during remission, as previously described in a variety of human cancers, including AML [54]. Moreover, luciferase assays with HEK293T cells showed that BCR-JAK2 has the ability to induce the *Bcl-xL* promoter.

Fusion TKs involved in leukemic processes are localized to the cytoplasm, where they maintain activated downstream effectors. Accordingly, we detected BCR-JAK2 protein in the cytoplasm, while pSTAT5 was found in the nucleus of Ba/F3-BCR-JAK2 cells as previously described for Ba/F3 expressing TEL-JAK2 [28].

TG101209-treated BCR-JAK2-expressing cells impaired both endogenous JAK2 and BCR-JAK2 phosphorylation and, consequently, STAT5 activation and *Bcl-xL* expression, all resulting in triggering of apoptosis. Treatment of Ba/F3-mock cells in the presence of IL-3 showed a lower inhibition of wild type JAK2 and

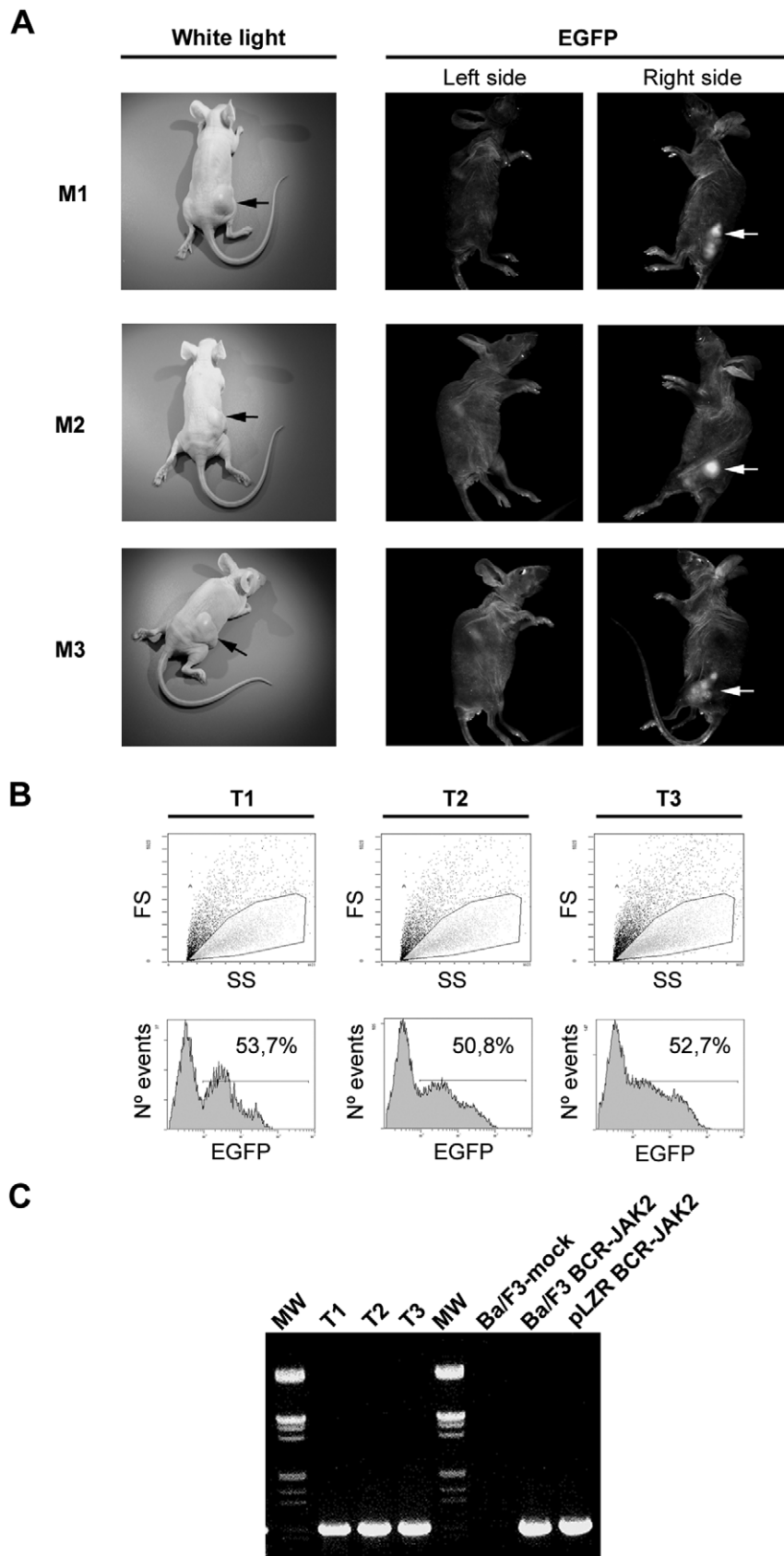


Figure 6. Nude mice injected with Ba/F3-BCR-JAK2 cells develop tumors. Mice were subcutaneously injected with 10^7 Ba/F3-mock cells (left flank) and Ba/F3-BCR-JAK2 cells (right flank). (a) Left panel: white light photograph showing mice bearing a tumor only on the right side, where Ba/F3-BCR-JAK2 cells were injected (black arrows). Right panel: EGFP⁺ tumor (white arrows) captured on a digital photostation showing the reflected

image of the mice (right side). No EGFP expression was detected when Ba/F3-mock cells were injected (left side). **(b)** Flow cytometry analysis of EGFP-expressing tumor cells. **(c)** RT-PCR analysis to detect BCR-JAK2 expression using BCR-B and JAK2-3 primers. RNA from three different tumors was analyzed compared with RNA from Ba/F3-mock and Ba/F3-BCR-JAK2 cells used as negative and positive controls, respectively. pLZR-BCR-JAK2: plasmid bearing BCR-JAK2 was used as positive control. MW, marker.
doi:10.1371/journal.pone.0032451.g006

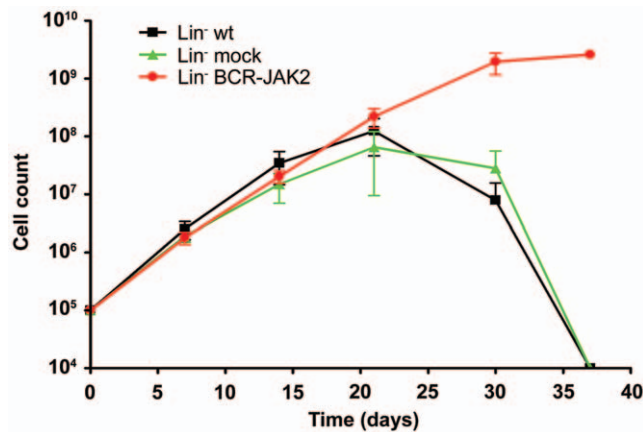


Figure 7. Lin⁻ primary progenitor cells expressing BCR-JAK2 show increased proliferation capacity compared to wild-type (wt) and mock progenitor cells. Lin⁻ progenitor cells obtained from Balb/c mice were transduced with pLZR (mock cells) or pLZR-BCR-JAK2 retroviral particles and seeded for proliferation assay during 30 days.
doi:10.1371/journal.pone.0032451.g007

STAT5 phosphorylation, as well as Bcl-xL protein expression. Also, apoptosis was lower than in Ba/F3-BCR-JAK2-treated cells, probably due to the anti-apoptotic role reported for IL-3 activation [36].

Finally, the usefulness of immunodeficient mice models to assess the propagation of oncoprotein-expressing cell lines [55], and to confirm their ability to produce tumors has been well established [42]. Here, we have shown how Ba/F3-BCR-JAK2 cells are able to induce tumors in nude mice, thus indicating that BCR-JAK2 has oncogenic properties. Further research will be developed to evaluate whether mouse Lin⁻ progenitors transduced with BCR-JAK2 are able to induce a hematopoietic disease in lethally irradiated recipient mice. Interestingly, this model will also serve as a useful approach for testing new JAK2 inhibitors such as TG101209.

Our results demonstrate that BCR-JAK2 is a hyperactive TK with transforming and tumorigenic properties based on sustained STAT5 activation and Bcl-xL induction leading to increased survival. Thus, we hypothesize that BCR-JAK2 could play a central role in the induction of lymphoproliferative disease in this patient. Further studies are necessary to elucidate the incidence of BCR-JAK2 fusion in the development of leukemia in the general population. JAK2 inhibitors abrogate BCR-JAK2 function by blocking the JAK2/STAT5 activation pathway, which in turn leads to cell death by apoptosis. We believe that abnormal fusion transcripts involving *JAK2* should be investigated in patients with atypical CML and acute types of leukemia. JAK2 inhibitors warrant further investigation for use alone or in combination with standard chemotherapy in treating human cancers with elevated JAK2 activity.

References

- Hoelzer D (1993) Acute lymphoblastic leukemia-progress in children, less in adults. *N Engl J Med* 329: 1343–1344.
- Neubauer H, Cumano A, Muller M, Wu H, Huffstadt U, et al. (1998) Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell* 93: 397–409.

Supporting Information

Figure S1 BCR-JAK2 breakpoint region sequence. **(a)** PCR product sequence (281 bp) obtained at diagnosis with the BCR-ABL primers used for p190 detection. Green, BCR-B primer sequence; black, BCR (exon 1); red, JAK2 (exon 19); blue, complementary sequence of ABL3 primer used for the first PCR amplification. The open reading frame is maintained. **(b)** Detailed sequence alignment analysis of reverse ABL3 primer (blue) showing 14 nucleotides (red) complementary to the flanking region of JAK2 sequence shown in **(a)**. (TIF)

Figure S2 BCR-JAK2 is located in the cytoplasm. Immunofluorescence analysis of HEK293T cells transiently transfected with pLZR carrying BCR-JAK2 (HEK293T-BJ) or control vector (HEK293T-mock) analyzed by confocal microscopy. Transfected cells were detected by EGFP expression. JAK2 expression was shown in red only in the cytoplasm of HEK293T-BJ cells. The merged image showed nuclei stained with DAPI (blue), EGFP (green), and anti-JAK2 Ab (red) on HEK293T-BJ transfected cells. Scale bar = 5 μ m. (TIF)

Figure S3 Quantification of Bcl-xL expression in the samples from the patient at diagnosis and at complete molecular remission (CMR) for BCR-JAK2. Bars represent relative Bcl-xL levels normalized using H3 and results are given as mean \pm SD (n = 3). (TIF)

Figure S4 BCR-JAK2 elicited Bcl-xL promoter activation. Luciferase assay of HEK293T cells transiently co-transfected with a plasmid bearing the promoter region of Bcl-xL tagged to luciferase (pGL2-promoter Bcl-xL 0.6R) together with plasmids coding for either BCR-JAK2 or a constitutively active STAT5. Luciferase activity induction was calculated as firefly/renilla luciferase activities and normalized using control vector-transfected levels. One representative experiment out of three is shown due to the high variation obtained by transient transfection experiments. (TIF)

Methods S1
(DOC)

Acknowledgments

We thank Dr. I. Sánchez-García for helpful discussion and critical reading of the manuscript. We also thank F. Molina-Jiménez for help in using the confocal microscope and Dr. I. Benedicto and P.L. Majano for technical assessment and advice. We thank Dr. A. Tefferi for helpful contacts with TargetGen Inc.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: EFR JAB JLV PR. Performed the experiments: ACD MO MSR CO MGD EA. Analyzed the data: ACD MO PR EFR. Contributed reagents/materials/analysis tools: JLS AF. Wrote the paper: ACD MO EFR.

3. Parganas E, Wang D, Stravopodis D, Topham DJ, Marine JC, et al. (1998) Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell* 93: 385–395.
4. Levy DE, Darnell JE, Jr. (2002) Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 651–662.
5. Sternberg DW, Gilliland DG (2004) The role of signal transducer and activator of transcription factors in leukemogenesis. *J Clin Oncol* 22: 361–371.
6. Lacronique V, Boureux A, Valle VD, Poirel H, Quang CT, et al. (1997) A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia. *Science* 278: 1309–1312.
7. Peeters P, Raynaud SD, Cools J, Wlodarska I, Grosgeorge J, et al. (1997) Fusion of TEL, the ETS-variant gene 6 (ETV6), to the receptor-associated kinase JAK2 as a result of t(9;12) in a lymphoid and t(9;15;12) in a myeloid leukemia. *Blood* 90: 2535–2540.
8. Reiter A, Walz C, Watmore A, Schoch C, Blau I, et al. (2005) The t(8;9)(p22;p24) is a recurrent abnormality in chronic and acute leukemia that fuses PCM1 to JAK2. *Cancer Res* 65: 2662–2667.
9. Griesinger F, Hennig H, Hillmer F, Podleschny M, Steffens R, et al. (2005) A BCR-JAK2 fusion gene as the result of a t(9;22)(p24;q11.2) translocation in a patient with a clinically typical chronic myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 44: 329–333.
10. Lane SW, Fairbairn DJ, McCarthy C, Nandini A, Perry-Keene J, et al. (2008) Leukaemia cutis in atypical chronic myeloid leukaemia with a t(9;22)(p24;q11.2) leading to BCR-JAK2 fusion. *Br J Haematol* 142: 503.
11. Cimena G, Aliano S, Fugazza G, Bruzzone R, Garuti A, et al. (2008) A BCR-JAK2 fusion gene as the result of a t(9;22)(p24;q11) in a patient with acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 183: 105–108.
12. Poitras JL, Dal Cin P, Aster JC, Deangelo DJ, Morton CC (2008) Novel SSBP2-JAK2 fusion gene resulting from a t(5;9)(q14.1;p24.1) in pre-B acute lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 47: 884–889.
13. Nebral K, Denk D, Attarbaschi A, Konig M, Mann G, et al. (2009) Incidence and diversity of PAX5 fusion genes in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 23: 134–143.
14. Van Roosbroeck K, Cox L, Tousseyn T, Lahortiga I, Gielen O, et al. (2011) JAK2 rearrangements, including the novel SEC31A-JAK2 fusion, are recurrent in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 117: 4056–4064.
15. Tefferi A, Gilliland DG (2007) Oncogenes in myeloproliferative disorders. *Cell Cycle* 6: 550–566.
16. Mullighan CG, Zhang J, Harvey RC, Collins-Underwood JR, Schulman BA, et al. (2009) JAK mutations in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 9414–9418.
17. Yoda A, Yoda Y, Chiaretti S, Bar-Natan M, Mani K, et al. (2010) Functional screening identifies CRLF2 in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 252–257.
18. Harvey RC, Mullighan CG, Wang X, Dobbin KK, Davidson GS, et al. (2010) Identification of novel cluster groups in pediatric high-risk B-precursor acute lymphoblastic leukemia with gene expression profiling: correlation with genome-wide DNA copy number alterations, clinical characteristics, and outcome. *Blood* 116: 4874–4884.
19. Pardanani A, Hood J, Lasho T, Levine RL, Martin MB, et al. (2007) TG101209, a small molecule JAK2-selective kinase inhibitor potently inhibits myeloproliferative disorder-associated JAK2V617F and MPLW515L/K mutations. *Leukemia* 21: 1658–1668.
20. Wernig G, Kharas MG, Okabe R, Moore SA, Leeman DS, et al. (2008) Efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in treatment of a murine model of JAK2V617F-induced polycythemia vera. *Cancer Cell* 13: 311–320.
21. Pardanani A (2008) JAK2 inhibitor therapy in myeloproliferative disorders: rationale, preclinical studies and ongoing clinical trials. *Leukemia* 22: 23–30.
22. Hitoshi Y, Lin N, Payan DG, Markovtsov V (2010) The current status and the future of JAK2 inhibitors for the treatment of myeloproliferative diseases. *Int J Hematol* 91: 189–200.
23. van Rhee F, Marks DI, Lin F, Szydlo RM, Hochhaus A, et al. (1995) Quantification of residual disease in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia: comparison of blood and bone marrow. *Leukemia* 9: 329–335.
24. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, et al. (1998) A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 72: 8463–8471.
25. Rio P, Segovia JC, Hanenberg H, Casado JA, Martinez J, et al. (2002) In vitro phenotypic correction of hematopoietic progenitors from Fanconi anemia group A knockout mice. *Blood* 100: 2032–2039.
26. Daley GQ, Baltimore D (1988) Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210bcr/abl protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 9312–9316.
27. Lacronique V, Boureux A, Monni R, Dumon S, Mauchauffe M, et al. (2000) Transforming properties of chimeric TEL-JAK proteins in Ba/F3 cells. *Blood* 95: 2076–2083.
28. Schwaller J, Frantsve J, Aster J, Williams IR, Tomasson MH, et al. (1998) Transformation of hematopoietic cell lines to growth-factor independence and induction of a fatal myelo- and lymphoproliferative disease in mice by retrovirally transduced TEL/JAK2 fusion genes. *EMBO J* 17: 5321–5333.
29. Baxter EJ, Hochhaus A, Bolufer P, Reiter A, Fernandez JM, et al. (2002) The t(4;22)(q12;q11) in atypical chronic myeloid leukaemia fuses BCR to PDGFRA. *Hum Mol Genet* 11: 1391–1397.
30. Demiroglu A, Steer EJ, Heath C, Taylor K, Bentley M, et al. (2001) The t(8;22) in chronic myeloid leukemia fuses BCR to FGFR1: transforming activity and specific inhibition of FGFR1 fusion proteins. *Blood* 98: 3778–3783.
31. McLaughlin J, Chianese E, Witte ON (1987) In vitro transformation of immature hematopoietic cells by the P210 BCR/ABL oncogene product of the Philadelphia chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 6558–6562.
32. Broome HE, Dargan CM, Krajewski S, Reed JC (1995) Expression of Bcl-2, Bcl-x, and Bax after T cell activation and IL-2 withdrawal. *J Immunol* 155: 2311–2317.
33. Socolovsky M, Fallon AE, Wang S, Brugnara C, Lodish HF (1999) Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a^{-/-}Stat5b^{-/-} mice: a direct role for Stat5 in Bcl-x(L) induction. *Cell* 98: 181–191.
34. Silva M, Benito A, Sanz C, Prosper F, Ekhterae D, et al. (1999) Erythropoietin can induce the expression of bcl-x(L) through Stat5 in erythropoietin-dependent progenitor cell lines. *J Biol Chem* 274: 22165–22169.
35. Amarante-Mendes GP, McGahon AJ, Nishioka WK, Afar DE, Witte ON, et al. (1998) Bcl-2-independent Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis: protection is correlated with up regulation of Bcl-xL. *Oncogene* 16: 1383–1390.
36. Horita M, Andreu EJ, Benito A, Arbona C, Sanz C, et al. (2000) Blockade of the Bcr-Abl kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-xL. *J Exp Med* 191: 977–984.
37. Yoshimura A, Ichihara M, Kinjo I, Moriyama M, Copeland NG, et al. (1996) Mouse oncostatin M: an immediate early gene induced by multiple cytokines through the JAK-STAT5 pathway. *Embo J* 15: 1055–1063.
38. Basham B, Sathe M, Grein J, McClanahan T, D'Andrea A, et al. (2008) In vivo identification of novel STAT5 target genes. *Nucleic Acids Res* 36: 3802–3818.
39. Warsch W, Kollmann K, Eckelhart E, Fajmann S, Cerny-Reiterer S, et al. (2011) High STAT5 levels mediate imatinib resistance and indicate disease progression in chronic myeloid leukemia. *Blood* 117: 3409–3420.
40. Ho JM, Beattie BK, Squire JA, Frank DA, Barber DL (1999) Fusion of the ets transcription factor TEL to Jak2 results in constitutive Jak-Stat signaling. *Blood* 93: 4354–4364.
41. Wilson-Rawls J, Xie S, Liu J, Laneville P, Arlinghaus RB (1996) P210 Bcr-Abl interacts with the interleukin 3 receptor beta(c) subunit and constitutively induces its tyrosine phosphorylation. *Cancer Res* 56: 3426–3430.
42. Puttini M, Coluccia AM, Boschelli F, Cleris L, Marchesi E, et al. (2006) In vitro and in vivo activity of SKI-606, a novel Src-Abl inhibitor, against imatinib-resistant Bcr-Abl⁺ neoplastic cells. *Cancer Res* 66: 11314–11322.
43. Brooks AR, Harkins RN, Wang P, Qian HS, Liu P, et al. (2004) Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle. *J Gene Med* 6: 395–404.
44. Prosch S, Stein J, Staak K, Liebenthal C, Volk HD, et al. (1996) Inactivation of the very strong HCMV immediate early promoter by DNA CpG methylation in vitro. *Biol Chem Hoppe Seyler* 377: 195–201.
45. Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D (1990) Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 247: 824–830.
46. Carron C, Cormier F, Janin A, Lacronique V, Giovannini M, et al. (2000) TEL-JAK2 transgenic mice develop T-cell leukemia. *Blood* 95: 3891–3899.
47. Mortuza FY, Papaioannou M, Moreira IM, Coyle LA, Gameiro P, et al. (2002) Minimal residual disease tests provide an independent predictor of clinical outcome in adult acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 20: 1094–1104.
48. McWhirter JR, Galasso DL, Wang JY (1993) A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Mol Cell Biol* 13: 7587–7595.
49. Hoelbl A, Kovacic B, Kerenyi MA, Simma O, Warsch W, et al. (2006) Clarifying the role of Stat5 in lymphoid development and Abelson-induced transformation. *Blood* 107: 4898–4906.
50. Ye D, Wolff N, Li L, Zhang S, Ilaria RL, Jr. (2006) STAT5 signaling is required for the efficient induction and maintenance of CML in mice. *Blood* 107: 4917–4925.
51. Hoelbl A, Schuster C, Kovacic B, Zhu B, Wickre M, et al. (2010) Stat5 is indispensable for the maintenance of bcr/abl-positive leukaemia. *EMBO Mol Med* 2: 98–110.
52. Million RP, Van Etten RA (2000) The Grb2 binding site is required for the induction of chronic myeloid leukemia-like disease in mice by the Bcr/Abl tyrosine kinase. *Blood* 96: 664–670.
53. Sattler M, Mohi MG, Pride YB, Quinnan LR, Malouf NA, et al. (2002) Critical role for Gab2 in transformation by BCR/ABL. *Cancer Cell* 1: 479–492.
54. Pallis M, Zhu YM, Russell NH (1997) Bcl-x(L) is heterogeneously expressed by acute myeloblastic leukaemia cells and is associated with autonomous growth in vitro and with P-glycoprotein expression. *Leukemia* 11: 945–949.
55. Van Etten RA (2001) Pathogenesis and treatment of Ph⁺ leukemia: recent insights from mouse models. *Curr Opin Hematol* 8: 224–230.

ANEXO II
Otras publicaciones